

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CAROLINE ELISE WACULICZ-ANDRADE

**Isolamento, identificação e sensibilidade a fungicidas de fungos
do gênero *Colletotrichum* de plantas de pomares cítricos**

CURITIBA

2013

CAROLINE ELISE WACULICZ-ANDRADE

**Isolamento, identificação e sensibilidade a fungicidas de fungos
do gênero *Colletotrichum* de plantas de pomares cítricos**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética, Setor de Ciências Biológicas, Departamento de Genética, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas, Área de concentração: Genética

Orientadora: Dr^a. Chirlei Glienke
Co-Orientador: Dr Marcel Bellato Spósito

CURITIBA

2013

PARECER

Os abaixo-assinados, membros da Banca Examinadora da defesa de tese de Doutorado, a qual se submeteu **CAROLINE ELISE WACULICZ-ANDRADE**, para obtenção do título de Doutora em Genética pela Universidade Federal do Paraná, no Programa de Pós-Graduação em Genética, são de parecer que se confira à candidata o conceito "A".

Secretaria da Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Genética do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Curitiba, 21 de novembro de 2013



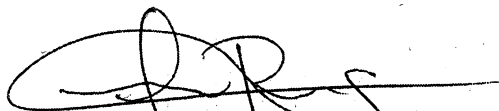
Doutor Nelson Sidnei Massola Júnior

Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz/USP – Membro Titular



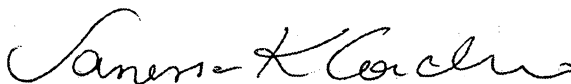
Doutora Yvelise Maria Possiede

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde/UFMS – Membro Titular



Doutor Fabrício Packer Gonçalves

Instituto Agrônomo do Paraná – Membro Titular



Doutora Vanessa Kava-Cordeiro

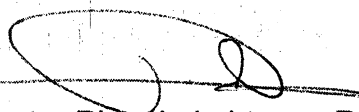
Dep. Genética/UFPR – Membro Titular



Doutora Chirlei Glienke

Dep. Genética/UFPR – Orientador e Presidente da Banca

Visto



Prof^o Dr. Ricardo Lehtonen R. de Souza
Coordenador do PPG - GEN - UFPR
Matrícula 176702

Professor Doutor Ricardo Lehtonen Rodrigues de Souza
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Genética



Ata da Defesa de Tese de doutorado de CAROLINE ELISE WACULICZ-ANDRADE

Aos vinte e um dias do mês de novembro do ano de dois mil e treze, foi realizada na sala sessenta e sete do Departamento de Genética do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, a Defesa de Tese da doutoranda **CAROLINE ELISE WACULICZ-ANDRADE**, intitulada "Isolamento, identificação e sensibilidade a fungicidas de fungos do gênero *Colletotrichum* de plantas de pomares cítricos". A abertura teve início às onze horas pelo Doutor **Ricardo Lehtonen Rodrigues de Souza**, Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Genética, que em seguida passou a palavra à Presidente da Banca Examinadora e Orientadora da aluna, Professora Doutora **Chirlei Glienke**, do Departamento de Genética da Universidade Federal do Paraná. A Presidente apresentou ao público presente os membros da Banca Examinadora e passou a palavra à aluna para que fizesse a apresentação sucinta da sua Tese. Após a explanação oral, a Doutora **Chirlei Glienke** passou a palavra ao primeiro examinador, Doutor **Nelson Sidnei Massola Júnior**, da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz da Universidade de São Paulo. Em seguida, passou a palavra à segunda examinadora, Doutora **Yvelise Maria Possiede**, do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Na sequência, passou a palavra ao terceiro examinador, Doutor **Fabício Packer Gonçalves**, do Instituto Agrônomo do Paraná. Em seguida, a quarta examinadora, Doutora **Vanessa Kava-Cordeiro**, do Departamento de Genética da Universidade Federal do Paraná, fez suas considerações. Findas as arguições pelos membros da banca, a Doutora **Chirlei Glienke** fez uma rápida apreciação das conclusões mais importantes dos debates realizados e comunicou que a Banca Examinadora iria proceder à discussão para atribuição dos conceitos, reunindo-se em sessão secreta. Os trabalhos foram interrompidos por cinco minutos. Após, foram proclamados os conceitos atribuídos pela Banca Examinadora, a seguir descritos: Doutor **Nelson Sidnei Massola Júnior**, conceito "A"; Doutora **Yvelise Maria Possiede**, conceito "A"; Doutor **Fabício Packer Gonçalves**, conceito "A"; Doutora **Vanessa Kava-Cordeiro**, conceito "A"; Doutora **Chirlei Glienke**, conceito "A", com o conceito médio final "A". Tendo cumprido o que dita o artigo setenta e cinco das Normas Internas do Programa, a candidata cumpriu os requisitos para obtenção do grau de Doutora em Genética. Como não havia nada mais a ser tratado, a Doutora **Chirlei Glienke**, após informar à candidata que ela tem, a partir desta data, até trinta dias para a entrega da versão definitiva de sua Tese e comprovante de submissão de pelo menos um artigo científico para um periódico de circulação internacional com cópia do(s) artigo(s), deu por encerrada a sessão. Eu, **Ricardo Lehtonen Rodrigues de Souza**, lavrei a presente ata, a qual assino juntamente com os senhores examinadores. Curitiba, vinte e um de novembro de dois mil e treze.



Vanessa Kava-Cordeiro *Yvelise Maria Possiede* *Fabício Packer Gonçalves* *Chirlei Glienke*

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me permitido chegar até aqui sempre com Luz Paz e Amor.

À Professora Dr^a. Chirlei Glienke pela oportunidade, ensinamentos e inestimáveis sugestões e contribuições oferecidas, que além de orientadora foi incentivadora e grande amiga em todos os momentos.

Ao co-orientador Professor Dr Marcel Spósito pela amizade e constante prontidão em me auxiliar com conselhos e sugestões acerca da realização deste trabalho.

À Professora Dr^a Vanessa Kava-Cordeiro, pela amizade, conselhos e palavras de incentivo em diversos momentos.

À Professora Lygia Vitória Galli Terasawa, pela amizade, confiança e por sempre me incentivar a prosseguir.

À minha banca de acompanhamento, Prof^a Dr^a Patrícia Dalzoto e Dr Marcio Pie, pelas sugestões e contribuições oferecidas, cooperando para o desenvolvimento desse trabalho.

À minha banca de defesa da tese, Dr Nelson Massola Júnior, Dr^a Yvelise Maria Possiede e Dr^a Vanessa Kava-Cordeiro, pelas sugestões, contribuições e correções que enriqueceram muito este trabalho.

Aos Professores do Departamento de Genética, que contribuíram para minha formação.

À amiga Andressa Peres Bini pela amizade, dedicação e por ter estado ao meu lado na bancada e fora dela. Seu auxílio foi de grande importância e colaboraram muito para a realização deste trabalho.

Aos amigos Marcos Paulo Rosa, Hellen Rosa e Kalinka Pereira Gonzales, por terem cada um colaborado em momentos diferentes, importantes e únicos para a realização deste trabalho.

À minha querida amiga Josiane Aparecida Gomes Figueiredo, que em tantos momentos foi importante e se fez presente como uma verdadeira amiga, estreitando ainda mais nossos laços de amizade.

Ao amigo Douglas Adamoski e Rodrigo Aluizio pela extrema bondade, dedicação e também por suas habilidades computacionais que muito me auxiliaram em diversas análises deste trabalho.

Ao amigo Eduardo Goulin pelo incentivo, auxílio e sugestões que em diversos momentos colaboraram para a realização deste trabalho e fizeram seu realizar mais tranquilo.

Ao amigo Paulo Camargo por seu auxílio e incentivo durante a realização deste trabalho.

Aos meus queridos amigos do LabGeM Lisandra Santos Ferreira, Daiani Cristina Savi, Angela Cristina Ikeda, Juliana Marta Muehlmann Fischer, Josiele Polzin de Oliveira, Camila Senkiv, Desirrê Petters, Felipe Borges dos Santos, Lorena Peña, Alan Silva, Renata Amorim, Marcela Dias que em diversas oportunidades puderam me auxiliar nas atividades do laboratório e fizeram os momentos de trabalho mais divertidos e agradáveis.

Ao Murilo Odilon Nichele Scroccaro secretário do Programa de Pós-Graduação em Genética que sempre prontamente me auxiliou com úteis informações facilitando os trâmites de documentos e cumprimento de prazos.

À minha querida amiga Juliana Fabris que incentivou a me aventurar no mundo dos fungos ingressando no LabGeM, e assim encontrei uma das realizações da minha vida.

Aos meus queridos amigos Juliana e Joaquim, Flávia e Daniel, Marcelo e Cristina, José Henrique e Marcia, Neto e Leo, Robson e Renatha casais incríveis por quem tenho muito carinho, pela torcida e apoio de sempre.

À toda a minha família que com grande torcida e apoio me auxiliaram a persistir e chegar até aqui.

Aos meus queridos pais Pedro e Daisi pelo grande amor, ajuda constante em todos os sentidos, pelo incentivo e confiança; além de toda a educação que me proporcionaram para a construção do conhecimento que me possibilitou conquistar esta vitória.

Ao meu irmão Guilherme pelas diversas vezes que cuidou de seus queridos sobrinhos para eu poder me dedicar aos estudos.

Ao meu irmão Kristoferson e minha cunhada Mariana que me incentivaram e me apoiaram nesta jornada junto com meus sobrinhos Noah, Yuli e Jade.

Aos meus sogros Cláudio e Noemi pelo apoio, incentivo, confiança e grande auxílio em diversos momentos. Grata pelos momentos que puderam ficar com as crianças para eu poder me dedicar a este trabalho.

Ao meu amado marido Clayson por todos os momentos de apoio, compreensão e carinho. E aos meus queridos filhos Tiago, João Pedro e Rafael por suas palavra e gesto de amor que expressaram seus sentimentos de compreensão e incentivo para a concretização desta tese.

À CAPES pelo apoio financeiro.

Essa mamãe querida que dá tanto amor para nós
Já está na última etapa do doutorado
E isso é uma grande vitória!
E uma grande conquista!
E quando ela terminar vai ser
Uma grande felicidade para todos nós!!!

João Pedro Waculicz Andrade (2013).

Resumo

A Podridão Floral dos Citros (PFC) é causada pela infecção de flores por fungos da espécie *Colletotrichum acutatum* e *C. gloeosporioides*, os quais produzem lesões marrom-alaranjadas nas pétalas de flores, acarretando a abscisão de frutos jovens e retenção de cálice. O patógeno é amplamente distribuído nos trópicos úmidos das Américas, principalmente em locais que propiciam mais de uma florada dos citros (*Citrus* spp.). A doença está presente em regiões do estado de São Paulo, Brasil, onde as condições climáticas são favoráveis. Na literatura não há relatos da presença de linhagens não patogênicas de *Colletotrichum* de forma endofítica; ou se está presente como patógeno latente em plantas cítricas ou em plantas da vegetação espontânea entre as floradas contribuindo como reservatório de inóculo para a disseminação da doença. Inicialmente, o agente causal da PFC foi identificado como sendo *Colletotrichum gloeosporioides*. Posteriormente, estudos utilizando marcadores moleculares, constataram que o agente responsável pela doença é *C. acutatum*. Estudo envolvendo teste de patogenicidade identificou o fungo *C. gloeosporioides* novamente como agente causal da PFC. A principal medida de controle da PFC é a utilização de pulverizações com fungicidas durante o florescimento e o desenvolvimento de isolados resistentes é uma grande preocupação no manejo da doença. A possibilidade de uso de *Agrobacterium tumefaciens* como ferramenta biotecnológica para realizar a transferência de gene de interesse para outros organismo é uma metodologia utilizada para estudos de interação planta-fungo. Dessa forma, os objetivos desse trabalho foram isolar e identificar as espécies de *Colletotrichum* endofíticos de plantas cítricas e plantas da vegetação espontânea por meio de características morfológicas e moleculares por PCR e sequenciamento multigênico; avaliar a patogenicidade dos isolados em flores de citros, verificar a resistência dos isolados quanto aos fungicidas carbendazim e triazol juntamente com o sequenciamento parcial do gene da β -tubulina; além de analisar o processo de penetração e colonização por meio de isolado agrotransformado com a expressão da proteína DsRed. Assim, foram obtidos 189 isolados endofíticos, 120 de plantas cítricas e 69 de plantas da vegetação espontânea, identificados por PCR como pertencentes ao Complexo de espécies *C. gloeosporioides* e por análise multigênica identificados como sendo da espécie *C. gloeosporioides stricto sensu*. Foi possível a identificação de uma região de 22 nucleotídeos variáveis no último exon do gene 18S do rDNA, gerando alteração na conformação do RNA ribossômico, ainda sem correlação com funcionalidade. O teste de patogenicidade permitiu identificar um isolado endofítico de citros causando sintomas da PFC em flores de citros. A resistência ao fungicida carbendazim foi observada em 37 dos 120 isolados de plantas de citros, todos de um mesmo pomar de citros com aplicação do fungicida há mais de 10 anos; e 43 dos 69 isolados de plantas da vegetação espontânea, todos categorizados como altamente resistentes; indicando que sua utilização prolongada gera isolados resistentes diminuindo sua efetividade no campo. O fungicida triazol teve sua concentração efetiva para inibição de 50% do crescimento micelial (CE_{50}) e a concentração mínima inibitória (CMI) alteradas quando comparados isolados de *C. gloeosporioides* e *C. acutatum*, sendo a efetividade de controle diminuída em isolados de *C. gloeosporioides*. Para o gene da β -tubulina, todos os 189 isolados de *C. gloeosporioides* apresentaram a mesma sequência. Não havendo alteração na região de nucleotídeos que codificam para os

códons onde já houve relato de mutação e associação com resistência a fungicidas. No entanto, nos códons 76, 80, 82, 169, 203 e 236 foram verificadas alterações na sequência dos nucleotídeos sem alteração do aminoácido gerado, até o momento sem associação com resistência ou identificação de sua funcionalidade. Foi ainda possível identificar penetração e colonização do isolado LGMF540-1t agrotransformado para a expressão da proteína DsRed após 28 dias de inoculação em folhas de citros, permitindo verificar a capacidade de infecção deste isolado endofítico de folha de citros.

Palavras chave: *Colletotrichum gloeosporioides*, Sequenciamento multigênico, resistência a fungicidas, Agrotransformação, Podridão Floral dos Citros (PFC).

Abstract

The Postbloom Fruit Drop (PFC) is caused by infection of flowers by *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides*, produces orange-brown lesions on petals and results in premature fruit drop and the retention of calyces. The pathogen is widely distributed in the humid tropics of the Americas, especially in places that provide more than one flowering citrus (*Citrus* spp.). The disease is present in regions of the state of São Paulo, Brazil, where climatic conditions are favorable. There are no published reports of the presence of non-pathogenic strains of endophytic *Colletotrichum*, or if it is present as latent pathogen in citrus plants or plants of natural vegetation between flowering contributing as a reservoir of inoculum for the spread of the disease. Initially, the causal agent of PFC was identified as *Colletotrichum gloeosporioides*. Subsequently, studies using molecular markers, found that the agent responsible for the disease is *C. acutatum*. Study involving pathogenicity test identified the fungus *C. gloeosporioides* as a new causal agent of PFD. It is mainly controlled by fungicide sprays during flowering, and the development of resistant strains is a major concern in the management of the disease. The possibility of the use of *Agrobacterium tumefaciens* as a biotechnological tool to transfer gene of interest to other organism, it is a methodology used to study the interaction plant-fungus. Thus, the present study aimed to isolate and identify the species of endophytic *Colletotrichum* isolates from citrus plants and natural vegetation through morphological and molecular characteristics as PCR and multigenic sequencing; evaluate the pathogenicity of the isolates in citrus flowers, verify the resistance of the isolates to carbendazim and triazole fungicide, and partial β -tubulin gene sequence; and analyse the process of penetration and colonization by an isolate agrotransformed expressing the protein DsRed. Were obtained 189 endophytic isolates, 120 from citrus plants and 69 from plants of natural vegetation identified by PCR as belonging to the *C. gloeosporioides* species complex, multigene analysis identified all the isolates as the species *C. gloeosporioides stricto sensu*. Identification of variable region of 22 nucleotides in the last exon of the gene 18S rDNA gene, generating changes in the conformation of the ribosomal RNA, without correlation with functionality. The pathogenicity test identified an isolate endophytic from citrus causing symptoms of PFC in citrus flowers. The resistance to carbendazim fungicide was observed in 37 of the 120 isolates from citrus plants, all from one citrus orchard with the application of the fungicide over 10 years; and 43 of the 69 isolates from natural vegetation, all categorized as highly resistant, indicating that its prolonged use generates resistant isolates decreasing its effectiveness in the field. The triazole fungicide had its effective concentration for 50% inhibition of mycelial growth (EC₅₀) and the minimum inhibitory concentration (MIC) changed compared isolates of *C. acutatum* and *C. gloeosporioides*; and the effectiveness of control decreased in isolates of *C. gloeosporioides*. For the β -tubulin gene, all 189 isolates of *C. gloeosporioides* showed the same sequence. There was no change in the nucleotide region encoding codons which have been reported mutations associated with resistance to fungicides. However, in codons 76, 80, 82, 169, 203 and 236 changes occur in the nucleotide sequence without altering the amino acid generated, to the moment no association with resistance or identification of its functionality; also was possible to identify penetration and colonization of isolated LGMF540 - 1t agrotransformed with gene DsRed after 28 days of inoculation in citrus leaves,

allowing to characterize how the infection process occurs in the presence of citric endophytic isolates.

Keywords: *Colletotrichum gloeosporioides*, Multigene sequencing, Fungicide resistance, Agrotransformation, Postbloom Fruit Drop (PFD).

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	OBJETIVOS	15
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
3.1	Podridão Floral dos Citros	16
3.2	Microrganismos Endofíticos	19
3.3	Fungos do Gênero <i>Colletotrichum</i>	23
3.4	Plantas da Vegetação Espontânea	27
3.5	Identificação por Marcadores Moleculares	29
3.6	Análise Filogenética	31
3.7	Transformação genética de fungos via <i>Agrobacterium tumefaciens</i> como ferramenta para estudos de interação com planta.	34
4	CAPÍTULO I: <i>Colletotrichum gloeosporioides stricto sensu</i>: UMA ESPÉCIE ENDOFÍTICA OU PATOGENICA EM CITROS NO BRASIL?	40
	Resumo	40
	CHAPTER I: <i>Colletotrichum gloeosporioides stricto sensu</i>: AN ENDOPHYTIC SPECIES OR CITRUS PATHOGENS IN BRAZIL?	42
	Abstract.....	42
4.1	Introdução	44
4.2	Materiais e Métodos	45
4.2.1	Isolamento de Fungos.....	45
4.2.2	Caracterização Morfológica.....	46
4.2.3	Caracterização Molecular.....	46
4.2.3.1	Extração de DNA	46
4.2.3.2	Identificação por PCR	47
4.2.3.3	Identificação por Sequenciamento	48
4.2.4	Teste de Patogenicidade.....	50
4.3	Resultados.....	51
4.3.1	Isolados.....	51
4.3.2	Caracterização Morfológica.....	52
4.3.3	Identificação por PCR	52
4.3.4	Identificação por sequenciamento.....	53
4.3.5	Teste de Patogenicidade.....	58
4.4	Discussão	58
4.5	Conclusão	61
4.6	Referências	62
5	CAPÍTULO II: RESISTÊNCIA DE <i>Colletotrichum gloeosporioides stricto sensu</i> A FUNGICIDAS BENZIMIDAZÓIS E MUTAÇÕES NO GENE DA β-TUBULINA	67
	Resumo	67
	Abstract.....	69
5.1	Introdução	70
5.2	Materiais e Métodos	72
5.2.1	Coleção de Isolados.....	72
5.2.2	Teste de Resistência aos Fungicidas.....	72
5.2.3	Extração de DNA	73
5.2.4	Análise por Sequenciamento Parcial do Gene β - tubulina	73

5.3	Resultados.....	75
5.3.1	Teste de Resistência aos Fungicidas.....	75
5.3.2	Análise por Sequenciamento Parcial do Gene <i>β-tubulina</i>	77
5.4	Discussão.....	79
5.5	Conclusão	82
5.6	Referências	83
6	CAPÍTULO III: PADRÃO DE INFECÇÃO E COLONIZAÇÃO DE	
	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> ENDOFÍTICO DE CITROS CAUSADOR DE	
	SINTOMAS DA PFC EXPRESSANDO O GENE REPÓRTER DSRED.	88
	Resumo	88
	Abstract.....	89
6.1	Introdução	90
6.2	Materiais e Métodos	92
6.2.1	Material Biológico.....	92
6.2.2	Agrotransformação.....	92
6.2.3	Caracterização e Seleção do Isolado transformado.....	93
6.2.4	Inoculação em Folhas cítricas.....	94
6.2.5	Análise dos Transformantes com Microscopia Fluorescente	95
6.2.6	Análise dos Transformantes por PCR	95
6.3	Resultados.....	96
6.3.1	Agrotransformação.....	96
6.3.2	Caracterização e Seleção do Isolado Transformado	96
6.3.3	Inoculação de Folhas Cítricas	97
6.3.4	Análise dos Transformantes com Microscopia Fluorescente	98
6.3.5	Análise dos Transformantes por PCR	98
6.4	Discussão	99
6.5	Conclusão	101
6.6	Referências bibliográficas	102
7	DISCUSSÃO	105
8	CONCLUSÕES GERAIS.....	109
9	REFERÊNCIAS.....	110

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor mundial de laranja, responsável por 50% da produção de suco da laranja, sendo 98% destinado às exportações. Este setor movimenta entre 1,5 e 2,5 bilhões de reais ao ano com as exportações e gera aproximadamente 230 mil empregos diretos e indiretos (NEVES *et al.*, 2010). O Estado de São Paulo é responsável por cerca de 80% da produção brasileira e 72% da área colhida no país, de aproximadamente 840 mil hectares (FNP, 2011).

A citricultura passou a ser cultivada em grande escala no século XX e desde então enfrentou graves problemas com pragas e doenças. Atualmente a citricultura enfrenta vários desafios, e os problemas fitossanitários ainda permanecem entre eles (DONADIO; MOURÃO; MOREIRA, 2005). A Podridão Floral dos Citros (PFC) vem se tornando cada vez mais importante desde a década de 1990, quando já estava incluída entre as principais doenças na cultura (FEICHTENBERGER, 2001).

A PFC teve inicialmente identificado como agente causal desta doença o fungo *Colletotrichum gloeosporioides* (FAGAN, 1979). Posteriormente, estudos utilizando marcadores moleculares foi constatado que o agente responsável pela doença é o fungo *C. acutatum* (BROWN *et al.*, 1996). No entanto, pesquisa realizada com fungos isolados de flores de citros apresentando sintomas de PFC foram identificados por PCR como sendo o fungo *C. gloeosporioides*; testes de patogenicidade e comparações do desenvolvimento da doença por *C. acutatum* e *C. gloeosporioides* indicaram *C. gloeosporioides* novamente como um dos agentes epidemiológicos da PFC (LIMA *et al.*, 2011). Desta forma, métodos moleculares como PCR e sequenciamento de DNA são ferramentas que vem sendo utilizadas na diferenciação das espécies do gênero *Colletotrichum*.

33

Para validar métodos de diagnóstico a serem realizados é premente verificar se estes fungos não estão presentes de forma endofítica em plantas cítricas. Não há relatos na literatura da presença de linhagens não patogênicas de forma endofítica nestas plantas. A ocorrência dessa doença em locais sem histórico da PFC, além da característica explosiva de epidemias, têm intrigado produtores e pesquisadores, principalmente no que se refere à origem do inóculo inicial. Há apenas um relato acerca da sobrevivência de *C. acutatum* em plantas

cítricas, segundo o qual, apressórios do fungo permanecem na superfície das folhas entre as floradas, originando conídios pelo estímulo de exsudados florais (ZULFIQAR, 1996). No entanto, essa hipótese não explicaria a ocorrência de severas epidemias em pomares isentos da doença.

Por outro lado, não está claro na literatura se estes fungos se apresentam como patógenos latentes em plantas cítricas entre as floradas ou mesmo em plantas da vegetação espontânea em pomares cítricos, contribuindo como reservatório de inóculo para a disseminação da doença.

Desde que a Podridão Floral dos Citros teve sua etiologia associada a fungo em 1979, seu controle é basicamente realizado através de pulverizações preventivas com fungicidas durante o período de florescimento (TIMMER & BROWN, 2000).

Os fungicidas benzimidazóis como é o Carbendazim (Derosal 500®) agem sobre a divisão celular e apresentam atividade seletiva para a β -tubulina de fungos (CHUNG *et al.*, 2010), o que os torna de alto risco de resistência (SANDERS; KORSTEN; WEHNER, 2000). Quando a resistência aos benzimidazóis já está estabelecida, ela se torna persistente e a aplicação sobre populações resistentes, em geral, agrava o problema (BRENT, 2007).

Os fungicidas triazóis como é o caso do Nativo®, o qual é constituído por Trifloxistrobina e Tebuconazol e tem sua atividade por meio das estrobilurinas que provocam inibição da cadeia respiratória inibindo o complexo III, interrompendo a fosforilação oxidativa e interferindo na ação a ATP-sintase. Os triazóis atuam inibindo a biossíntese do ergosterol, substância importante para a manutenção da integridade da membrana celular das células fúngicas (WONG & MIDLAND, 2007).

Este fungicida vem sendo utilizado no controle da PFC e antracnoses, no entanto a avaliação de resistência tem sido pouco estudada para este grupo. No Brasil não há trabalhos realizados para verificar o surgimento de populações de espécies de *Colletotrichum* resistentes a triazóis em pomares cítricos.

Métodos moleculares como PCR e a comparação de sequências da região ITS1-5,8S-ITS2 do rDNA entre as espécies do gênero permitem a identificação de espécies tais como *C. acutatum* (AFANADOR-KAFURI; MINZ; MAYMON; FREEMAN, 2003), *C. boninense* (PILEGGI *et al.*, 2009) e espécies do complexo *C. gloeosporioides* (DU *et al.*, 2005). O aumento do uso de abordagens como a filogenia molecular para caracterizar a diversidade de espécies de *Colletotrichum*

(MILLS; SREENIVASAPRASAD; BROWN, 1992, DU *et al.*, 2005), o uso de filogenia multilocus e o conceito filogenético de espécie (TAYLOR *et al.*, 2000) vem se tornando componentes integrais do estudo da sistemática (GUERBER *et al.*, 2003; CROUCH *et al.*, 2006; CROUCH *et al.*, 2009; DAMM *et al.*, 2009, 2012a, 2012b; WEIR *et al.*, 2012).

Outra abordagem molecular que vem sendo utilizada é a transformação de isolados de *Colletotrichum* por meio da agrotransformação pela utilização de gene repórter para verificar como se dá a relação planta-patógeno (HOROWITZ *et al.*, 2002; MÜNCH *et al.*, 2011).

Neste contexto, a identificação das espécies de *Colletotrichum* patogênicas à uma determinada espécie hospedeira, bem como a determinação de sua variabilidade, patogenicidade, resistência a fungicidas e sua forma de interação com a planta, são fundamentais para o desenvolvimento de estratégias mais eficientes de controle, além de propiciar um melhor entendimento da epidemiologia da doença.

2 OBJETIVOS

- Verificar quais as espécies de *Colletotrichum* estão presentes em plantas cítricas entre as floradas e em plantas da vegetação espontânea em pomares cítricos, contribuindo como reservatório de inóculo para a disseminação da doença Podridão Floral dos Citros.
- Avaliar a diversidade das espécies de *Colletotrichum* isoladas por meio do sequenciamento da região ITS1-5,8S-ITS2 do rDNA e parcial do genes 18S do rDNA; GPDH (glicerol 3-fosfato desidrogenase); actina, calmodulina e quitina.
- Avaliar a especificidade dos *primers* existentes e propor nova estratégia para diagnóstico de *Colletotrichum gloeosporioides stricto sensu*;
- Avaliar a patogenicidade dos isolados endofíticos de folhas de citros e da vegetação espontânea em testes em flores de citros.
- Avaliar o padrão de resistência ao fungicida carbendazim (Derosal 500[®]) e correlacionar com SNPs nas sequências do gene beta-tubulina de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides*.
- Avaliar o padrão de resistência ao fungicida triazol (Nativo[®]) de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides*.
- Avaliar o padrão de infecção e colonização de folhas de citros de *C. gloeosporioides* utilizando linhagem expressando o gene repórter Dsred.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Podridão Floral dos Citros

A doença Podridão Floral dos Citros (PFC) é conhecida no Brasil, pelo menos desde 1977 em laranjas, quando foi inicialmente relatada no Rio Grande do Sul por Porto, Rossetti e Dornelles, após a queda de frutos atingirem proporções alarmantes, com redução de 95% da safra daquele ano. Posteriormente foi identificada em pomares de São Paulo, onde causou prejuízos importantes nas safras 77/78 e 90/91 (FEICHTENBERGER, 1991).

Na Flórida (EUA), a doença foi constatada em 1983, causando grandes prejuízos na primavera de 1988, principalmente em pomares de laranjas de Umbigo e de 'Valência' (SONODA & HEBB, 1991).

Atualmente no Brasil a doença atinge todos os municípios de São Paulo e outros Estados como Rio de Janeiro, Paraná, Minas Gerais, Goiás, Pará, Sergipe e Amazonas (KUPPER; GIMENES-FERNANDES; GOES, 2003).

A Podridão Floral dos Citros (PFC) ou Queda Prematura dos Frutos Cítricos teve inicialmente identificado como agente causal o fungo *Colletotrichum gloeosporioides* (FAGAN, 1979).

Posteriormente, em um minucioso estudo realizado em isolados de *C. gloeosporioides* de plantas cítricas, Agostini e Timmer (1992) identificaram três estirpes com características morfológicas e patogênicas distintas: FGG ("fast-growing gray"), com rápido crescimento em meio de cultura, coloração acinzentada e incapaz de causar podridão floral; SGO ("slow-growing orange"), com crescimento lento em meio de cultura e patogênica em botões florais, e KLA ("Key lime anthracnose"), com características morfológicas semelhantes à estirpe SGO e associada à antracnose do limão galego. Apenas em 1996, Brown e colaboradores, com o uso de marcadores moleculares e meios seletivos, reclassificaram as estirpes SGO e KLA como *Colletotrichum acutatum* e as diferenciou da estirpe FGG, *Colletotrichum gloeosporioides*.

Pesquisa com fungos isolados de flores de citros apresentando sintomas de PFC foram identificados por PCR como sendo o fungo *C. gloeosporioides*;

testes de patogenicidade e comparações do desenvolvimento da doença por *C. acutatum* e *C. gloeosporioides* indicaram *C. gloeosporioides* novamente como um dos agentes epidemiológicos da PFC (LIMA *et al.*, 2011).

A infecção por *C. acutatum* ocorre apenas em pétalas de flores e origina acérvulos 4 a 5 dias após a instalação do fungo. Estes passam a produzir conídios em abundância, os quais são dispersos por respingos de chuvas para outras flores durante o período de floração. A disseminação da doença é fortemente dependente do regime de chuvas, quanto mais distribuídas durante a floração maior será a incidência da doença (FEICHTENBERGER, MÜLLER; GUIRADO, 1997). Assim, locais com condições mais úmidas, com grande intensidade de chuvas e variedades de citros que propiciem mais de uma florada no ano favorecem o aparecimento da doença (FEICHTENBERGER, 1991). Segundo Agostini, Gottwald e Timmer, (1993) o orvalho e a neblina também propiciam infecções localizadas de flores, a partir de folhas ou outras flores infectadas. No Brasil, a doença é mais severa em laranja “Pera” (*Citrus. sinensis* Osbeck), limões verdadeiros [*Citrus limon* (Linn.) Burm], em lima ácida “Tahiti” (*Citrus latifolia* Tanaka) e no limão “Galego” (*Citrus aurantifolia* Swingle) (FEICHTENBERGER, 1991).

Os sintomas iniciais mais evidentes da doença são lesões alaranjadas nas pétalas de flores abertas (TIMMER *et al.*, 1994). Condições climáticas favoráveis propiciam o desenvolvimento rápido do fungo comprometendo os tecidos da pétala, que ficam rígidos e secos, firmemente aderidos ao disco basal, diferentemente do que ocorreria com flores saudáveis, em que as pétalas caem logo após sua abertura (FIGURA 1). Essa sintomatologia levou à denominação da anomalia de “post-bloom fruit drop” ou Podridão Floral dos Citros.



FIGURA 1 – Pétalas de citros apresentando lesões de Podridão Floral.
(Fonte: Fundecitrus)

Quando há incidência severa da doença as lesões podem ocorrer antes mesmo da abertura das flores, provocando podridão completa dos botões florais. Frequentemente, observa-se a necrose do pistilo, iniciando-se no estigma e descendo pelo estilo. Crescimentos fúngicos alaranjados podem também ser vistos nos estiletes dos estames, no estigma, estilo, ou no nectário (FEICHTENBERGER; MÜLLER; GUIRADO, 1997). Os discos basais, os cálices e os pedúnculos ficam aderidos aos ramos formando estruturas que recebem o nome de “estrelinhas”, enquanto os frutos recém-formados apresentam uma descoloração amarelo-pálida e caem rapidamente (FEICHTENBERGER; MÜLLER; GUIRADO, 1997) (FIGURA 2).



FIGURA 2 – Lesões em botões florais e aspecto “estrelinha”, característicos da doença Podridão Floral.(Fonte: Fundecitrus)

O mecanismo envolvido na queda prematura, causada por *C. acutatum*, já foi atribuído a um desequilíbrio nos níveis hormonais intracelulares de regulação do crescimento da planta (CHUNG *et al.*, 2003; LI *et al.*, 2003; LAHEY *et al.*, 2004; CHEN *et al.*, 2006). Inicialmente suspeitou-se que o causador da queda prematura fosse uma anomalia fisiológica, o que levou pesquisadores a avaliar a aplicação de produtos com ação hormonal, como 2,4-D (ácido diclorofenoxiacético que pode atuar como mimetizador de auxinas), no controle da doença (WEIR; PHELPS, 1968, citados por FAGAN, 1984). Muito embora esses produtos tenham apresentado resultado na maior retenção de frutos, a descoberta do fungo *Colletotrichum gloeosporioides* como agente causal, alterou a maneira de controle voltando-se para o uso de fungicidas. A elevada eficiência de fungicidas como o

captafol e benomil, utilizados em mistura ou não, manteve a Podridão Floral dos Citros sob controle nos locais em que ela se tornou endêmica (FAGAN, 1984)

A pulverização com fungicidas durante o florescimento é essencial para o controle da doença (DENHAM; WALLER, 1981; TIMMER & BROWN, 2000). Os fungicidas captafol e benomil eram os principais utilizados para esse fim (FAGAN, 1984; TIMMER *et al.*, 1994), no entanto, com a proibição destes fungicidas, outros como carbendazim, traizóis, folpet e difenoconazole passaram a ser utilizados para o controle da PFC no Brasil, porém com efetividade muito variável (PERES *et al.*, 2002; GOES *et al.*, 2008). Desta forma, para melhorar a eficiência do controle da PFC e reduzir a probabilidade de fungos *Colletotrichum* se tornarem resistentes a fungicidas, a busca por novos produtos se torna essencial, assim como a realização de monitoramento da resistência aos fungicidas.

3.2 Microrganismos Endofíticos

A presença de microrganismos em partes aéreas de plantas, em geral, é associada a sintomas que promovem algum prejuízo ao tecido vegetal. Entretanto, a presença de fungos em tecidos assintomáticos tem sido relatada em vários estudos, colonizando o interior dos tecidos vegetais sem causar dano aparente ou o aparecimento de sintomas de doenças. Tais microrganismos receberam a denominação de fungos endofíticos ou endófitos.

Bary, em 1866, introduziu o termo endófito, citado por Stone (1988), sendo aplicado à flora microbiana interna dos tecidos vegetais, em casos de infecções assintomáticas ou não, e nos casos de interações de antagonistas ou simbioses. Carroll (1988), no entanto, restringiu o uso do termo endofítico, aplicando somente para organismos que em seu processo de colonização não causam sintomas ao hospedeiro, desta forma excluindo os organismos patogênicos e mutualísticos.

Petrini em 1986, constatando a presença de fungos endofíticos em diversas espécies vegetais pode sugerir que todas as plantas têm potencial para serem hospedeiras destes microrganismos. Descobertas de diferentes aspectos da interação dos fungos com os seus hospedeiros levaram Petrini a propor uma abrangência maior para o termo endófito, assim incluindo todos os microrganismos que habitam a parte aérea das plantas, sendo capazes de colonizar, em alguma

fase de seu ciclo de vida, os tecidos internos dos vegetais sem causar dano aparente, (PETRINI, 1991).

Assim, microrganismos endofíticos são aqueles que passam todos ou uma parte de seu ciclo de vida colonizando entre e/ou intracelularmente os tecidos da planta hospedeira, tipicamente sem causar sintomas aparentes de doença (PETRINI, 1991; CABRAL, STONE; CARROLL, 1993; BACON; WHITE, 2000; TAN; ZOU, 2001; NETO; AZEVEDO; ARAÚJO, 2002).

A diferenciação entre endofíticos, epifíticos (aqueles microrganismos que vivem na superfície da planta) e fitopatogênicos (aqueles que causam doenças às plantas) depende do nicho ocupado em determinado estágio e da interação do microrganismo com o hospedeiro (STROBEL *et al.*, 2004), portanto a aplicação destes termos tem puro significado didático, havendo dificuldade em determinar limites entre eles (AZEVEDO; SERAFINE; BARROS, AZEVEDO 2002).

A colonização interna das folhas pode ter como origem a infecção sistêmica de sementes e pecíolos; através de micélios de fungos epifíticos que atingem seu interior por meio de aberturas naturais, podendo ser em raízes, estômatos e hidatódios; ou ainda, o microrganismo pode aproveitar-se de feridas existentes no hospedeiro, causadas por patógenos e insetos (BERNSTEIN e CARROLL, 1977).

Outra maneira de entrada no hospedeiro seria através de uma ação ativa do endófito, isto é, pela produção de enzimas ou estruturas que facilitariam a penetração no hospedeiro (AZEVEDO, 1998). Os mecanismos de infecção dos fungos endofíticos ainda não estão totalmente desvendados, mas inúmeros fatores envolvidos na colonização da planta, provavelmente são similares aos das linhagens patogênicas.

A entrada da maioria dos fungos patogênicos ou não, na planta hospedeira, é dependente da diferenciação do micélio em estruturas especializadas, denominadas de apressórios (KUBO *et al.*, 1996). Algumas espécies de *Colletotrichum*, *Magnaporthe* e *Phyllosticta* produzem apressório complexo e fortemente pigmentado com melanina (SHAW; KUO; HOCH, 1998). Este pigmento é o responsável por criar uma pressão hidrostática essencial para ação mecânica (HOWARD & FERRARI, 1989; BOURETT e HOWARD, 1990). Dois produtos químicos capazes de inibir a síntese de melanina são o Triciclazol e o Piroquion,

que ao serem aplicados em conídios, resultam na produção de apressórios sem pigmento e desta forma, não funcionais, tornando o fungo incapaz de penetrar na planta hospedeira (WOLOSHUK; SISLER, 1982; BELL; WHEELER, 1986; DEAN, 1997). A colonização endofítica pode ser intracelular e limitada a poucas células, intercelular e localizada ou ainda inter e intracelular sistêmica e pode se desenvolver em qualquer tecido ou órgão do vegetal: raiz, caule, ramos, folhas, flores e frutos (PEIXOTO-NETO; AZEVEDO; ARAÚJO, 2002; SCHULZ; BOYLE, 2005; MARINHO *et al.*, 2005; JOHRI, 2006).

Estando o microrganismo dentro do hospedeiro, ocorre a colonização da planta pelo endófito. Segundo White Jr. e Cole (1985) e Carroll (1988) em gramíneas, como no caso de *Acremonium* sp em *Festuca* sp, os endófitos geram uma infecção sistêmica sendo transmitidos de uma geração para outra, geralmente através das sementes dos hospedeiros, não necessitando desta forma, esporular (CLAY, 1987). Tais fungos são denominados por Carroll (1988) como mutualistas obrigatórios, constitutivos. Entretanto, na maioria das plantas os endófitos mutualistas facultativos, que segundo Carroll (1988) não são transmitidos via semente, propagam-se aparentemente, por meio de esporos, sendo dispersos principalmente pela chuva e correntes de ar, podendo também ocorrer através de propágulos vegetativos de alguns hospedeiros. Estes fungos possuem uma associação muito menor com o hospedeiro quando comparados aos mutualistas constitutivos, geralmente vivendo em tecidos senescentes ou metabolicamente inativos, tais como o córtex ou epiderme, e colonizando tecidos vitais somente quando o hospedeiro é ferido ou estressado por ataques de insetos ou patógenos (CARROLL, 1988; McCUTCHEON; CARROLL; SCHWAB, 1993).

Embora as interações entre vegetais e endófitos, na maioria dos casos ainda não sejam bem esclarecidas, já tem sido verificado que os endófitos apresentam uma relação mutualística, antagonística ou neutra com o hospedeiro. Em alguns casos foram encontradas interações que levam a um melhor desempenho das plantas (CLAY, 1987), como aumento de área foliar e maior número de ramificações (LATCH & CHRISTENSEN, 1985); maior tolerância ao ataque de insetos (CARROLL e CARROLL, 1978; CLAY, 1987; CLEMENTE *et al.*, 1990; CARROLL, 1988; AZEVEDO *et al.*, 2000); resistência a doenças e parasitas (WHITE Jr. & COLE, 1985; WHITE Jr. & COLE, 1986; CLARK; MILLER e WHITNEY, 1989; CALHOUN *et al.*, 1992); resistência a nematódeos (WILSON;

CLEMENTE e KAISER, 1991); e antiherbivoria pela produção de toxinas (WHITE Jr. & COLE, 1985).

Os fungos endofíticos são considerados de grande importância, uma vez que representam uma fonte potencial de novos compostos químicos e biológicos, podendo ser utilizados não somente para resolver e auxiliar problemas de saúde humana, mas também para plantas e animais (STROBEL, 2002; STROBEL, 2003). Alguns fungos endofíticos têm sido amplamente estudados devido à sua ação antimicrobiana. Segundo Ezra e Strobel (2003), o fungo *Muscodor albus* inibe e mata espécies de fungos e bactérias por emissão de compostos orgânicos voláteis. O mesmo foi relatado para o fungo *Gliocladium* sp (STINSON *et al.*, 2003), e para diversos fungos endofíticos isolados de espécies de *Garcinia* (PHONGPAICHIT *et al.*, 2006).

Comumente de um único vegetal podem ser obtidos de dezenas a centenas de isolados e, a partir de um único hospedeiro, pelo menos uma espécie pode se mostrar específica, confirmando o fato que os endofíticos são importantes componentes da diversidade microbiana (TAN; ZOU, 2001; STROBEL; DAYSE, 2003). Os endófitos interagem com diversos tipos vegetais como plantas herbáceas (TAESHOWISAN; PEBERDY; LUMYONG, 2003), plantas de florestas tropicais (STROBEL, 2002), plantas medicinais (FIGUEIREDO *et al.*, 2007; PILEGGI *et al.*, 2009) e plantas aquáticas (CHEN *et al.*, 2003).

Os endófitos podem ainda, desempenhar relevante função para a sanidade do vegetal, já que atuam como agentes controladores de microrganismos fitopatogênicos, no controle de insetos e até mesmo protegendo a planta contra herbívoros (NETO; AZEVEDO; ARAUJO, 2002). Microrganismos que beneficiam e colonizam o interior do hospedeiro e que formam estruturas visíveis são intensamente estudados. Este é o caso das bactérias fixadoras de nitrogênio que formam nódulos em raízes e os fungos micorrízicos, que entre outros efeitos benéficos, aumentam a absorção dos nutrientes pelos seus hospedeiros. No final dos anos 70, vários estudos demonstraram que os microrganismos endofíticos possuíam algumas funções imprescindíveis para a defesa de seus hospedeiros (NETO; AZEVEDO; ARAUJO, 2002).

Figueiredo e colaboradores (2007) relataram a presença de fungos do gênero *Pestalotiopsis* sp endofíticos da planta medicinal *Maytenus ilicifolia* no Brasil, com atividade antimicrobiana contra *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*,

Micrococcus luteus, *Staphylococcus aureus* e *S. aureus* resistente à metilina (MRSA). A capacidade de colonizar tecidos internos de hospedeiros fez com que os endófitos se tornassem valiosos para a agricultura como uma ferramenta para melhorar o desempenho da produção agrícola (AZEVEDO *et al.*, 2000).

O processo de isolamento de endófitos exige cuidados especiais para que sejam excluídos os microrganismos que vivem na superfície do hospedeiro, os epífitos. A desinfestação da superfície das folhas, caules e outros órgãos vegetais é uma etapa fundamental para o adequado isolamento destes microrganismos. Os tempos de tratamento e a concentração do agente desinfetante podem variar de acordo com a textura do material a ser utilizado, razão pela qual devem ser feitos testes preliminares para a adequação da metodologia de isolamento, para que apenas os microrganismos epifíticos, mas não os endofíticos sejam eliminados (GLIENKE-BLANCO, 1999). Os meios de cultura devem ser apropriados, de acordo com o grupo de endófitos que se deseja isolar, podendo ser acrescentadas substâncias seletivas, como antibióticos, que inibem o crescimento de bactérias, ou fungicidas, que restringem o crescimento de fungos. Outras variáveis igualmente importantes devem ser consideradas, como a idade da planta e dos órgãos utilizados, o local e a época da coleta, a temperatura de incubação das placas para o isolamento, além da recorrência do isolado, revelando o seu verdadeiro estado endofítico (PETRINI, 1991; GOES; KIMATI, 1997; AZEVEDO, 1998).

3.3 Fungos do Gênero *Colletotrichum*

Fungos do gênero *Colletotrichum* são organismos celulares e eucariotos, classificados como pertencente ao reino Fungi, filo Ascomycota, classe Sordariomycetes, ordem Glomerellales e família Glomerellaceae

O gênero *Colletotrichum* Corda (Teleomorfo: *Glomerella* Stonem) possui uma ampla história biológica e taxonômica. Em 1831 foi estabelecido por Corda, sendo caracterizado pela presença de frutificações setosas, denominadas de acérvulos, nos quais conídios hialinos são produzidos em massa alaranjada ou creme. Inicialmente, houve confusão entre dois gêneros, *Colletotrichum* e *Vermicularia* Tode, descrito em 1790. Este último, muito mais antigo, havia sido revalidado em 1825 por Fries, cuja característica principal era a presença de

corpos de frutificação semelhantes a estroma. Em 1884, Saccardo considerou os corpos de frutificação de *Vermicularia* como sendo uma fase de desenvolvimento do acérvulo de *Colletotrichum* (MENEZES, 2006).

Por outro lado, gênero *Gloeosporium* Desm. & Mont, em 1849, já havia sido descrito, sendo muito semelhante a *Colletotrichum*, no entanto não produzia setas no acérvulo. Assim, considerando esta característica, o agente da antracnose da banana, durante muito tempo, foi colocado no gênero *Gloeosporium*, sendo então denominado *Gloeosporium musarum* Cooke & Massie. Entretanto, como a formação de setas não é uma característica estável, variando de acordo com as condições do ambiente físico e nutricional, deixou de ser um critério de valor taxonômico, para separação dos gêneros *Colletotrichum* e *Gloeosporium*. Deve ser ressaltado que em isolados de *Colletotrichum*, particularmente, *C. gloeosporioides*, a produção de setas no acérvulo pode variar de abundante, rara ou ausente, em meio de BDA (batata–dextrose–ágar), sob temperatura de 25°C (Menezes & Hanlin, 1996).

Numa tentativa de elucidar a incerteza taxonômica de *Colletotrichum*, von Arx (1957 a,b), em suas revisões, concluiu que muitas espécies fúngicas incluídas nos gêneros *Colletotrichum*, *Vermicularia* e *Gloeosporium* pertenciam a um mesmo gênero, tendo então decidido conservar o nome *Colletotrichum* contra *Vermicularia*, rejeitando o nome *Gloeosporium*.

O gênero *Colletotrichum* apresenta similaridade genética com taxons que compreendem endofíticos, saprofíticos e fungos patogênicos de plantas (KUMAR, HYDE *et al.*, 2004; PHOTITA *et al.*, 2004). Espécies de *Colletotrichum* são fitopatógenos importantes nas regiões tropicais e subtropicais do mundo e são os causadores de uma diversidade de doenças conhecidas como antracnose. Tais doenças podem causar considerável perda em um grande número de culturas como em cereais, café e legumes (BAILEY; JEGGER, 1992; LENNÉ, 1992), antracnose pós-colheita de frutos tropicais como o abacate, banana, manga (MORDUE, 1967; JEFFRIES *et al.*, 1990) e citros (FISHER; LOURENÇO; AMORIM, 2008); também queda prematura dos frutos cítricos (KUPPER; GIMENES-FERNANDES; GOES, 2003), além de serem encontrados em frutos caídos de plantas silvestres (TANG; HYDE; CORLETT, 2003).

Espécies de *Colletotrichum* que causam sérias doenças em plantas são comumente isolados como endofíticos de plantas saudáveis, e têm sido

identificados também como saprofíticos em matéria morta de plantas (PHOTITA *et al.*, 2001a, 2004; PROMPUTTHA *et al.*, 2002; TOOFANEE; DULYAMAMODE, 2002; KUMAR; HYDE, 2004).

Há vários relatos na literatura identificando isolados endofíticos, saprofíticos e muitos patógenos como *Colletotrichum gloeosporioides* ou *Colletotrichum* spp. (BROWN; SREENIVASAPRASAD; TIMMER, 1996; BUSSABAN *et al.*, 2001; PHOTITA *et al.*, 2001b; PROMPUTTHA *et al.*, 2002). *Colletotrichum gloeosporioides* é um endófito comumente isolado de uma grande variedade de espécies de plantas (RODRIGUES, 1994; BUSSABAN *et al.*, 2001; PHOTITA *et al.*, 2001b).

A caracterização e determinação taxonômica de *Colletotrichum* spp eram tradicionalmente realizados apenas com base em caracteres morfológicos e culturais. Análise da morfologia de conídios e apressórios, presença de setas e do teleomorfo *Glomerella*, coloração de colônia, produção de pigmentos e taxa de crescimento, características normalmente observadas (SMITH; BLACK, 1990; SUTTON, 1992). Tais características são ainda utilizadas para identificação e estudo da variabilidade de *Colletotrichum* spp, sendo empregadas em associação com marcadores moleculares (ABANG *et al.*, 2002; PERES *et al.*, 2002; TALHINHAS *et al.*, 2002; TOZZE JÚNIOR; MELLO & MASSOLA JÚNIOR, 2006; ANDRADE *et al.*, 2007; PILEGGI *et al.*, 2009).

A alta variabilidade de *Colletotrichum* spp sob diferentes condições de cultivo, a falta de padronização de condições culturais empregadas nos diferentes estudos e a plasticidade dos fungos pela preferência por seus hospedeiros tem tornado a análise apenas de caracteres morfológicos não confiáveis na identificação de isolados deste gênero (SUTTON, 1992; FREEMAN; KATAN; SHABI, 1998). A diferenciação entre espécies com base apenas no círculo de hospedeiros ou hospedeiro de origem também não são critérios confiáveis. É frequente a ocorrência de mais de uma espécie de *Colletotrichum* associada a uma mesma hospedeira e uma mesma espécie pode estar presente em múltiplas hospedeiras (FREEMAN; KATAN; SHABI, 1998). Como exemplo, *Colletotrichum gloeosporioides* e *C. acutatum*, em geral, apresentam sintomas semelhantes como as podridões de frutos em pós-colheita (PERES *et al.*, 2002).

Uma das principais limitações da classificação de espécies com base apenas em caracteres morfológicos é que a variação apresentada pelos indivíduos

pode não representar espécies diferentes, e sim uma variabilidade fenotípica dentro da mesma espécie. E da mesma forma, indivíduos com características morfológicas semelhantes podem representar espécies diferentes. Especialmente quando traços fenotípicos similares estão presentes em vários grupos distintos (VINNERE, 2004).

Desta forma, técnicas moleculares são métodos alternativos para o estudo taxonômico sendo importantes ferramentas para a resolução de problemas na delimitação de uma espécie (MACLEAN *et al.*, 1993) e são ferramentas úteis na diferenciação das espécies do gênero *Colletotrichum* (LOPEZ, 2001; AFANADOR-KAFURI *et al.*, 2003; MARTÍNEZ-CULEBRAS *et al.*, 2003; CHUNG *et al.*, 2006; PILEGGI *et al.*, 2009, DAMM *et al.*, 2012a, 2012b; WEIR *et al.*, 2012).

A comparação de sequências da região ITS1-5,8S-ITS2 do rDNA entre *C. gloeosporioides* e outras espécies do gênero levaram ao desenvolvimento de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) taxon-específicos para a diferenciação entre espécies do gênero *Colletotrichum* por PCR (reação em cadeia da polimerase) (MILLS *et al.*, 1992). Esses *primers* foram utilizados em diversos estudos para a confirmação da identidade de isolados patogênicos a diversas espécies hospedeiras (FREEMAN; KATAN; SHABI, 1998; FREEMAN; HOROWITZ; SHARON, 2001; AFANADOR-KAFURI, 2003; MORIWAKI; SATO; TSUKIBOSHI, 2003; TOZZE JUNIOR, 2007; PILEGGI *et al.*, 2009).

No entanto, com a utilização de marcadores moleculares e características morfológicas, foi possível perceber que estes primers considerados taxon-específicos na realidade identificavam complexos de espécies, como o caso de *C. acutatum*, *C. boninense* e *C. gloeosporioides*.

A análise multilocus de filogenia molecular pode ser utilizada como ferramenta para a separação de espécies dentro destes complexos de espécies. Para o complexo de espécies *C. acutatum*, uma análise multilocus utilizando ITS, actina, tubulina 2, quitina, GPDH e histona 3 puderam caracterizar esse complexo com a identificação de 31 espécies, destas 21 ainda não haviam sido descritas (DAMM *et al.*, 2012a). No complexo de espécies de *C. boninense* foi possível identificar 18 espécies com a utilização de ITS, actina, tubulina 2, quitina, GPDH, calmodulina e histona 3 (DAMM *et al.*, 2012b). Da mesma forma, Weir e colaboradores (2012) puderam identificar 22 espécies e uma subespécie dentro do

complexo de espécies *C. gloeosporioides* com a utilização de ITS, GPDH, actina, calmodulina e quitina.

A identificação das espécies de *Colletotrichum* presentes em uma determinada planta hospedeira, bem como a determinação de sua diversidade, são fundamentais para o desenvolvimento de estratégias eficientes de controle de doenças, além de propiciar um melhor entendimento da sua epidemiologia.

3.4 Plantas da Vegetação Espontânea

A presença de plantas da vegetação espontânea dentro de áreas agrícolas pode representar prejuízos, pois as mesmas podem servir como hospedeiras intermediárias para pragas e patógenos (LORENZI, 2000; MILEO *et al.*, 2006). A caracterização destas plantas se dá pela alta capacidade reprodutiva, por crescerem em lugares inóspitos, por apresentarem dispersão de sementes pelo vento, pelo hábito agressivo, resistência ao controle químico e pela ocupação de extensas áreas. O conjunto destes fatores permitem que essas plantas sirvam de potenciais fontes de inóculo de fitopatógenos para as plantações de espécies comerciais (CHAVES *et al.*, 2003).

As espécies de plantas pertencentes às famílias *Asteraceae*, *Amaranthaceae*, *Chenopodiaceae*, *Commelinaceae*, *Solanaceae*, *Fabaceae*, *Plantaginaceae*, *Malvaceae* e *Tropaeolaceae* já foram descritas como hospedeiras naturais de fitovírus (CHAVES *et al.*, 2003). Ainda, estudos mostram que 15% dos fitovírus já identificados no mundo foram descritos em espécies da vegetação espontânea (CHAVES *et al.*, 2003).

Batista (1984) estudou plantas da vegetação espontânea presentes em cultivos de guaranazeiro. Tal cultivo tem o fungo *Colletotrichum guaranicola* como causador da antracnose, principal doença desta cultura. O estudo revelou a presença desse fungo nas plantas da vegetação espontânea existentes no cultivo. Segundo Mileo e colaboradores (2007), há ainda presença de espécies de plantas da vegetação espontânea que se mostram mais suscetíveis à presença de patógenos endófitos, as quais servem de fonte de inóculo e de disseminação da antracnose, nas áreas onde há a cultura do guaranazeiro. Estudos realizado em plantas da vegetação espontânea presente nos locais de cultivo e a verificação da

associação destas com o fungo causador da doença estudada são de fundamental importância para epidemiologia e controle da doença.

Ainda há relatos na cultura do tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.), onde as plantas da vegetação espontânea foram encontradas como sendo hospedeiras de begomovírus. Arnaud e colaboradores (2007) identificaram begomovírus, através de PCR e ELISA, nas plantas da vegetação espontânea existentes na cultura, reforçando a idéia de que a transmissão do vírus nessa cultura pode estar relacionada com a presença do patógeno nestas plantas, servindo como hospedeiros alternativos na cultura do tomateiro.

O fungo *Phakopsora pachyrhizi* Syd. & Syd. é o causador da ferrugem asiática, uma doença com grande relevância na cultura de soja, uma vez que causa muitas perdas na produção, inviabilizando a colheita. Esse patógeno sobrevive apenas em tecidos vivos, sendo assim, hospedeiros alternativos como plantas da vegetação espontânea podem servir de fonte de inóculo para a cultura da soja, pois permitem a sobrevivência do fungo (SOUZA, 2007). Souza (2007) inoculou esporos do fungo em 9 espécies diferentes de leguminosas empregadas como adubo verde, e todas desenvolveram sintomas, confirmando o potencial desses hospedeiros alternativos em servirem de fonte de inóculo para a doença no cultivo da soja.

Muitas doenças podem ser influenciadas pela presença de plantas da vegetação espontânea. Menezes (1999) relatou presença de plantas da vegetação espontânea contribuindo como fonte de inóculo em algumas doenças em feijão como o mosaico dourado, tombamento, podridão cinzenta do caule, galha das raízes e mofo branco. As plantas da vegetação espontânea que se mostraram como hospedeiras alternativas foram: leiteiro (*Euphorbia heterophylla*), guanxuma (*Sida* spp.), corda de viola (*Ipomoea* spp.), trapoeraba (*Commelina benghalensis*), picão preto (*Bidens pilosa*), carrapicho-rasteiro (*Acanthospermum australe*), tiririca (*Cyperus esculentus*), mentrasto (*Ageratum conyzoides*), carrapicho-de-carneiro (*Acanthospermum hispidum*), erva-de-santa-luzia (*Chamaesyce hirta*) e quebra-pedra (*Phyllanthus tenellus*). Em monoculturas como a do feijão, a rotação de cultura é bastante empregada e as plantas hospedeiras servem de reservatório para os patógenos nesse período (COBUCCI; STEFANO; KLUTHCOUSKI, 1999).

3.5 Identificação por Marcadores Moleculares

A identificação precisa de microrganismos patogênicos é de fundamental importância na fitopatologia, na ciência médica, em estudos ambientais e no controle biológico. A identificação precoce do agente causal é primordial para se buscar mais rapidamente medidas de controle e prevenção das doenças de plantas (ATKINS; CLARK, 2004).

Tradicionalmente, a identificação de fungos filamentosos está baseada principalmente em características morfológicas, microscópicas e macroscópicas. No entanto, esse método exige tempo e nem sempre apresenta resultados precisos, muitas vezes levando a incorreto diagnóstico e interpretação dos resultados (ATKINS; CLARK, 2004).

A variabilidade genética em microrganismos pode ser detectada por técnicas clássicas ou moleculares. As técnicas clássicas baseiam-se na análise de fenótipos a partir de características morfológicas como conidiação, crescimento, cor e forma da colônia, ou por características bioquímicas, como produção de substâncias, restringindo a possibilidade de se conduzir estudos populacionais e muitas vezes, de sistemática. As técnicas moleculares, por sua vez, fornecem ferramentas para evidenciar e entender melhor diversos aspectos relacionados diretamente ou indiretamente com o DNA. Desta forma, a análise do DNA vem sendo amplamente utilizada na diferenciação de indivíduos e no esclarecimento filogenético dos organismos estudados. Os dados moleculares frequentemente complementam e corroboram hipóteses baseadas em estudos morfológicos.

A tecnologia do DNA recombinante e o desenvolvimento da amplificação de segmentos de DNA via PCR (Polymerase Chain Reaction), abriram o caminho para uma mudança no paradigma genético clássico: da inferência do genótipo a partir do fenótipo, para a análise genética direta da variação na sequência de DNA.

Os marcadores moleculares, baseados em PCR, podem ser utilizados no estudo da evolução molecular, na detecção de infecções microbianas através da amplificação do DNA do patógeno com primers ou oligonucleotídeos iniciadores específicos ao seu genoma e na medicina forense (WATSON *et al.*, 1992; ALBERTS *et al.*, 1994).

Um grande número de estudos tem utilizado sequências do DNA ribossômico (rDNA) com diversas aplicações na genética, evolução e

melhoramento, podendo ser utilizado para uma ampla faixa de níveis taxonômicos. Este interesse está diretamente relacionado à estrutura desta região, que se encontra em locais específicos do genoma, e repetida em sequência inúmeras vezes.

Ao contrário de outras sequências repetitivas que aparentemente não tem função conhecida no genoma, a função do rDNA é a de codificar as diferentes moléculas do RNA ribossômico, representando extrema importância no processo de tradução de proteínas. Em geral, as regiões 28S, 18S e 5,8S das unidades de repetição, não apresentam variações de sequência, enquanto que as regiões internas que são transcritas, conhecidas como ITS (Internal Transcribed Spacer), variam enormemente. Desta forma, as sequências codificantes do rDNA evoluem muito lentamente e são altamente conservadas, possibilitando a sua utilização em estudos com organismos pouco relacionados taxonomicamente. Ao contrário do rDNA, as regiões espaçadoras internas destes genes (ITS), evoluem rapidamente, apresentando alto polimorfismo, e sendo assim, de grande interesse nos estudos filogenéticos a níveis de gêneros, espécies e populações (WHITE & MORROW, 1990).

Afanador-Kafuri e colaboradores (2003) utilizando tais sequências, foram hábeis em diferenciar espécies de *Colletotrichum* presentes em tamarillo, passiflora e manga. Moriwaki, Sato e Tsukiboshi (2003) descreveram, por meio da análise destas sequências, uma nova espécie, *Colletotrichum boninense* estudando um grupo heterogêneo de isolados no Japão, inicialmente identificados como *C. gloeosporioides*.

Lubbe e colaboradores (2004) identificaram a presença de *C. acutatum*, *C. gloeosporioides*, *C. crassipes* e *C. boninense* presentes em *Proteaceae*. Em 2005, Farr e colaboradores utilizando esta mesma abordagem molecular diferenciaram espécies de *Colletotrichum* em *Agavaceae*.

Pileggi *et al.* (2009) por meio de PCR e sequenciamento da região ITS identificaram isolados pertencentes as espécies *C. gloeosporioides* e *C. boninense* como endofíticos de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss.

No entanto, com o maior número de trabalhos sendo realizados com a análise do rDNA, foi sendo percebido que para *Colletotrichum*, apenas esta região não seria capaz de separar os isolados analisados em espécies, identificando assim, complexos de espécies, como o caso de *C. acutatum*, *C. boninense* e

C. gloeosporioides. Assim, outras regiões foram sendo acrescentadas em estudos envolvendo identificação e filogenia destas espécies. Diferentes regiões de introns passaram a ser analisadas, como o caso da enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GPDH) que é essencial na via da glicólise e da glicogênese; a calmodulina (CAL) proteína relacionada na regulação do cálcio celular; actina (ACT) importante proteína do citoesqueleto; quitina (CHS-1) forma microfibrilas importantes para a morfologia da parede celular e β -tubulina proteína responsável pela formação de microtúbulos durante a divisão celular (Damm *et al.*, 2012a, 2012b; Weir *et al.*, 2012)

3.6 Análise Filogenética

Desde que a informação necessária para o funcionamento dos organismos está no DNA, ou RNA em alguns vírus, pode-se realizar estudos de parentesco evolutivo dos mesmos pela comparação das sequências presentes no ácido desoxirribonucleico. Este método possui diversas vantagens sobre os métodos clássicos baseados em características morfológicas e fisiológicas (NEI; KUMAR, 2000). As alterações evolutivas do DNA seguem um padrão relativamente regular, é possível utilizar modelos matemáticos para formular a taxa de mudança e comparar DNAs de organismos distantemente relacionados. Além disso, o genoma de todos os organismos consiste de longas sequências de nucleotídeos, contendo, portanto, uma quantidade muito maior de informações filogenéticas que características morfológicas. Por essas razões, filogenias moleculares podem clarificar muitos padrões de ramificação da árvore da vida, os quais tem sido difíceis de interpretar por metodologias clássicas (NEI; KUMAR, 2000). Entretanto, deve-se ter cuidado ao optar pelo método que mais condiz com determinada situação, de forma a evitar erros sistemáticos. Os métodos mais comumente usados são métodos de distância, métodos de parcimônia, métodos de máxima verossimilhança e inferência Bayesiana.

Nos métodos de distância, ou métodos de matrizes de distância, a divergência entre duas sequências (DNA, RNA ou proteína) é expressa como a fração dos sítios que diferem entre tais sequências em um alinhamento. De

maneira geral, quanto mais similar entre si for um par de sequências, estas serão mais próximas evolutivamente. Também, quanto mais tempo se passa desde a divergência de dois organismos, isto é, duas sequências, a partir de um ancestral comum, maior será o percentual de diferenças entre as sequências correspondentes. Embora esta última suposição pareça lógica, nem sempre é verdadeira, pois algumas linhagens podem evoluir mais rapidamente que outras; mesmo se duas linhagens evoluam com a mesma velocidade, ou seja, com a mesma taxa de mutações, tal suposição talvez seja falsa devido a múltiplas substituições (HALL, 2001). Devido a estas peculiaridades, muitas vezes os métodos de distância subestimam a real quantidade de mudanças, ou mutações, ao longo das linhagens. A forma mais simples de determinar a distância entre sequências homólogas de DNA, ou de proteínas, é através da proporção de sítios nos quais duas sequências são diferentes, em relação ao total de nucleotídeos, ou aminoácidos. Essa proporção, conhecida como distância p , pode ser facilmente estimada pela relação $p=nd/n$, onde nd representa a quantidade de sítios divergentes entre duas sequências com n nucleotídeos, ou aminoácidos (NEI; KUMAR, 2000).

A partir de dados obtidos por modelos matemáticos de distância, podem ser construídas árvores filogenéticas de distâncias. Diversos modelos computacionais realizam esse trabalho, sendo que os mais populares são o UPGMA (“Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Mean”) e Neighbor Joining (NJ) (HALL, 2001). Estes usam uma série específica de cálculos, através de métodos algorítmicos, para estimar uma árvore filogenética, a partir de uma matriz de distâncias calculadas com sequências de DNA ou proteínas. Tais cálculos envolvem a manipulação de uma matriz de distância, a qual é derivada de um alinhamento múltiplo de sequências. Iniciando com tal alinhamento, ambos os programas calculam a distância; ou seja, a fração de diferenças, para cada par de sequências e acumulam esses dados numa matriz de dados.

O método UPGMA é um método de agrupamento (clustering) que está embutido na suposição de que as árvores filogenéticas construídas são aditivas, ou seja, são ultramétricas, de forma que todos os táxons (ou sequências) são igualmente distantes de um grupo externo (“raiz”), e que a distância de grupos irmãos a seu ancestral comum é idêntica, suposições que são pouco prováveis de serem verdadeiras. Por esse motivo, e outros detalhes, UPGMA é raramente usado

atualmente. O método Neighbor Joining é similar ao UPGMA na manipulação dos dados em matrizes de distância, entretanto, ele não constrói agrupamentos (clusters), mas calcula diretamente a distância em relação a nós internos da árvore filogenética. NJ não assume que todos os táxons sejam equidistantes da raiz, dessa forma, a distância de táxons irmãos, a um determinado nó (ancestral comum), pode ser diferente (HALL, 2001). Os demais métodos, máxima parcimônia e máxima verossimilhança, são baseados na análise do estado de caracteres e não em matrizes de distância. Eles utilizam os múltiplos alinhamentos diretamente, através da comparação dos estados dos caracteres dentro de cada coluna (cada posição) no alinhamento.

Os métodos de parcimônia foram originalmente desenvolvidos para caracteres morfológicos e existem muitas versões diferentes (NEI; KUMAR, 2000). A parcimônia é baseada na suposição que a topologia (árvore) mais provável é aquela que requer o menor número de mudanças para explicar um determinado alinhamento. A premissa básica desse método é que os táxons (sequências) compartilham características comuns porque eles herdaram tal característica de um ancestral comum. Esse método é intuitivo porque ele satisfaz a noção de que o cenário evolutivo mais provável é aquele que requer o menor número de eventos (os eventos nesse caso são mutações). Através desse método, frequentemente são geradas inúmeras árvores filogenéticas sutilmente diferentes, as quais são consistentes com o mesmo número mínimo de eventos evolutivos, e, portanto, igualmente parcimoniosas (HALL, 2001).

Nos métodos de Máxima Verossimilhança, observando um determinado conjunto de dados de sequências, e considerando um determinado modelo evolutivo, a probabilidade é maximizada para cada topologia, sendo que a topologia que apresenta a máxima verossimilhança (maior probabilidade de ser verdadeira) é escolhida como o modelo final. Ou seja, esse método procura pela topologia que, sob algum modelo evolutivo pré-determinado, maximize a verossimilhança (possibilidade) dos dados observados (HALL, 2001). Esse método quase sempre produz uma única árvore. A vantagem é que ele permite especificar o modelo evolucionário para um determinado conjunto de dados (alinhamento), de forma que a possibilidade da árvore resultante ser verdadeira é previamente conhecida. Entretanto, uma desvantagem da máxima verossimilhança é que ela é

bem mais lenta que métodos de distâncias ou parcimônia, sendo muitas vezes necessárias semanas para a realização da análise.

A análise Bayesiana baseia-se no conhecimento da distribuição *a posteriori* dos parâmetros genéticos e possibilita a construção de intervalos de confiança, que são melhor definidos como intervalos de probabilidade ou intervalos de confiança Bayesiano, exatos para as estimativas dos parâmetros genéticos. Assim, esta análise propicia uma descrição mais completa sobre a confiabilidade dos parâmetros genéticos.

3.7 Transformação genética de fungos via *Agrobacterium tumefaciens* como ferramenta para estudos de interação com planta.

Os sistemas de transformação genética têm sido empregados com diversos objetivos, mas principalmente para estudos de interação fungo-planta e enterrupção gênica para estudo de diferentes genes, principalmente relacionados à patogenicidade (MULLINS; KANG, 2001).

O gênero *Agrobacterium* é composto por cinco espécies, as quais *A. tumefaciens* faz parte. É uma bactéria de solo, aeróbica, gram-negativa, não formadora de esporos, capaz de induzir a formação de tumores em plantas (BRASILEIRO, 1998; BRASILEIRO; LACORTE, 1998; STAFFORD, 2000). A metodologia de transformação genética mediada por *Agrobacterium* foi inicialmente empregada de forma eficiente como mediadora da transformação primeiramente de leveduras (BUNDOCK *et al.*, 1995), posteriormente adaptada para fungos filamentosos (De GROOT *et al.*, 1998) e até mesmo de células humanas (KUNIK *et al.*, 2001), sendo utilizada também com grande sucesso para transformação de células vegetais (TZFIRA; CITOVSKEY, 2006).

Ao infectar as plantas, *Agrobacterium* têm a capacidade de causar uma doença denominada de galha-da-coroa, caracterizada pela proliferação sem controle das células próximas à região do colo da planta, resultando na formação de um tumor (SAVKA *et al.*, 1996; AGRIOS, 1997). Nessas bactérias, a presença de um plasmídeo de alto peso molecular (200Kb), denominado de Ti (“tumor inducing”), está associada à essa capacidade de infecção. O plasmídeo Ti contém vários genes responsáveis pela transferência do T-DNA (DNA de transferência). Os

responsáveis por essa transferência estão localizados em uma região do plasmídeo Ti que é denominada “região *vir*”. A região *vir* tem cerca de 30Kb e contém pelo menos 10 genes (*vir* A – *vir* J), cujos produtos são vitais para o processamento e transferência do T-DNA à planta (WEI *et al.*, 2000), fortemente induzida pelo composto denominado de acetoseringona (AS) (KADO, 1991).

O T-DNA é uma região que contém oncogenes e é flanqueada por duas sequências curtas, de aproximadamente 25 pares de bases, denominadas de borda esquerda (LB) e borda direita (RB). O processo de transferência envolve uma série de etapas tais como quimiotaxia, adesão, indução da expressão dos genes *vir*, processamento do T-DNA, transferência do T-DNA, direcionamento do T-DNA ao núcleo e integração no genoma da célula hospedeira (TZFIRA; CITOVSKEY, 2006; CITOVSKEY *et al.*, 2007).

Para a transformação genética *in vitro* via *Agrobacterium tumefaciens*, o plasmídeo Ti das linhagens de *Agrobacterium* não apresenta a região T-DNA nem as bordas LB e RB, e assim a bactéria perde a capacidade de transferir material genético para a célula hospedeira. Dessa forma, o plasmídeo Ti passa a ser denominado de plasmídeo desarmado ou *helper*, pois apesar de não ter a região T-DNA, contém os genes *vir* responsáveis pela maquinaria de transferência. Já a região do T-DNA é modificada pela remoção dos oncogenes substituídos por genes de interesse e inserida em um segundo vetor, denominado de vetor binário, que são vetores derivados de plasmídeos capazes de se replicar tanto em *Escherichia coli* quanto em *Agrobacterium*, e se mantém de forma independente do plasmídeo Ti. Esse vetor binário é reintroduzido em uma linhagem de *A. Tumefaciens* contendo o plasmídeo desarmado que readquire a capacidade de transformar células hospedeiras. (LACORTE & ROMANO *et al.*, 1998).

Uma das vantagens de se utilizar o método baseado em *Agrobacterium* para transformar fungos filamentosos está relacionada à eficiência de transformação. Alguns trabalhos comparam a eficiência de transformação obtida por esse método com aquela obtida por protoplasto PEG e/ou Biobalística, e demonstram que o sistema *Agrobacterium* permite a obtenção de um número maior de transformantes (AMEY *et al.*, 2002; CAMPOY *et al.*, 2003; FITZGERALD *et al.*, 2003; RODRIGUEZ-TOVAR *et al.*, 2005). Além disso, pode-se citar a facilidade quanto ao material do inóculo inicial do fungo a ser utilizado no processo, apresentando várias opções como micélio, esporos, corpos de frutificação; bem

como a geração de um banco de transformantes mitoticamente estáveis podendo ser utilizados para inúmeras pesquisas futuras, desde sua caracterização até seu potencial biotecnológico.

A metodologia de agrotransformação, por apresentar inúmeras vantagens, vem sendo utilizada cada vez mais para fungos filamentosos. É crescente o número de trabalhos que utilizam essa metodologia, sendo que hoje mais de uma centena de fungos já foi transformada por essa ferramenta biotecnológica, incluindo fungos dos filos Ascomycota, Basidiomycota, Zigomicota, Glomeromycota e também Oomicetos (MICHIELSE *et al.*, 2005; LACROIX *et al.*, 2006; FÁVARO, 2009, FIGUEIREDO *et al.*, 2010).

A integração do DNA exógeno em fungos filamentosos pode ocorrer tanto por recombinação homóloga como por recombinação heteróloga, sendo que esta tem sido bastante utilizada para a obtenção de mutagênese aleatória em substituição aos métodos para obtenção de mutantes via mutagênese química e radioativa (KHANG *et al.*, 2005). A vantagem da mutagênese insercional via T-DNA sobre os métodos clássicos de indução de mutação, é que as sequências que flanqueiam o sítio de inserção podem ser identificadas facilmente. A identificação dessas regiões permite associar a função de um gene a um dado fenótipo mutante. Dentro desse contexto, ou seja, de mutagênese insercional com vistas à obtenção de mutantes aleatórios e subsequente identificação do gene mutado, é extremamente importante o número de cópias do DNA exógeno integrado ao genoma do fungo transformado por *Agrobacterium*. A obtenção de transformantes com inserções únicas é desejável, pois só assim pode-se assegurar que o fenótipo mutante está associado ao gene interrompido. A maioria dos trabalhos que fizeram uso do sistema *Agrobacterium* para transformação de fungos demonstra que o T-DNA se insere em sítios aleatórios, e que há uma predominância de inserções únicas no genoma do hospedeiro (DeGROOT *et al.*, 1998; COVERT *et al.*, 2001, MORIOKA *et al.*, 2006). Essas características tornam o método de agrotransformação bastante atraente quando se deseja obter fenótipos mutantes e identificar os genes a estes relacionados via mutagênese insercional aleatória (RHO *et al.*, 2001; COMBIER *et al.*, 2003; WHITE; CHEN, 2007; ZHANG *et al.*, 2007; TALHINHAS *et al.*, 2008). Outra utilidade atrativa é quando se deseja realizar estudos para mutagênese direcionada ou em experimentos de nocaute gênico

(GOUKA *et al.*, 1999; ZWIERS *et al.*, 2001; ZHANG *et al.*, 2003; ZEILINGER, 2004; SUGUI *et al.*, 2005; KHANG *et al.*, 2005, GONG *et al.*, 2007).

Vários métodos têm sido descritos para identificar as sequências que flanqueiam as bordas direita e esquerda do T-DNA inserido em um genoma fúngico (BALZERGUE *et al.*, 2001; COTTAGE *et al.*, 2001). Dentre essas metodologias a técnica de TAIL-PCR (*Thermal Asymmetric Interlaced*), descrita primeiramente por Liu e colaboradores (1995), vem sendo bastante utilizada na tentativa de identificar genes em organismos eucarióticos. Ela permite rápido e eficiente reconhecimento das sequências que flanqueiam o T-DNA no genoma transformado (van ATTIKUM *et al.*, 2001; MULLINS *et al.*, 2001; RHO *et al.*, 2001; COMBIER *et al.*, 2003; FÁVARO, 2009). Essa técnica baseia-se em reações de PCR consecutivas usando *primers* de sequências específicas e *primers* de sequências degeneradas. A especificidade do produto resultante após três *rounds* de amplificações é alta, o que permite seu sequenciamento e identificação.

Muitos trabalhos utilizam essa ferramenta para o estudo e descoberta de genes envolvidos no processo de patogenicidade em plantas ou animais e também para fungos endofíticos como *P. fortinii* (GORFER *et al.*, 2007), *A. Implicatum* (ABELLO; KEKEMU; GARCÍA, 2008) e *Epicoccum nigrum* (FÁVARO, 2009), visando estudos para o melhor entendimento dessa interação benéfica.

Dessa forma, por essa metodologia apresentar muita eficiência e adaptabilidade, além de não requerer equipamentos caros, sua utilização como ferramenta de estudos para a transformação genética de fungos patogênicos torna-se altamente atrativa. Mesmo que uma espécie fúngica ainda não possua uma metodologia como essa descrita, a consistência e articularidade da técnica permitem que o protocolo seja especificado para essa espécie em particular, abrindo caminho para novos estudos e permitindo sua otimização. Assim, auxilia nos estudos de interação entre fungos e a planta hospedeira por meio da transferência de genes repórteres, o que permite um monitoramento do desenvolvimento dessa interação durante os estágios de colonização do tecido hospedeiro, revelando detalhes dessa relação entre esses organismos.

Nos estudos de interação fungo-planta a transformação genética mediada por *A. Tumefaciens* pode contribuir para o estudo da biologia da interação entre fungos endofíticos e a planta hospedeira por meio da transferência de genes repórteres e monitoramento da expressão desses genes durante os estágios de

colonização do tecido hospedeiro. Os genes chamados de repórteres, sob condições apropriadas, promovem uma mudança na coloração de estruturas do fungo, e assim permitindo a visualização fácil de aspectos que se deseja estudar. (MULLINS; KANG, 2001). Os sistemas repórteres mais comuns são o do GUS (gusA, β - 'D-glicoronidase de *Escherichia coli*), onde as estruturas ou células transformadas adquirem coloração azulada na presença da enzima X-glicuronidase (JEFFERSON; KAVANAGH; BEVAN, 1987), e da proteína GFP (gene *gfp* da proteína verde fluorescente de *Aequorea victoria*), onde as estruturas ou células transformadas emitem fluorescência verde em resposta à exposição à luz ultravioleta ou luz azul (CHALFIE *et al.*, 1994; HASELOFF; DORMAND; BRAND, 1999). O fato da alta estabilidade dessa proteína, a qual necessita apenas de luz UV ou luz azul e oxigênio para emissão de fluorescência, não requerendo cofatores ou substratos para a atividade, faz a proteína GFP apresentar vantagens no estudo da interação fungo-planta em relação aos demais repórteres.

A proteína fluorescente vermelha (DsRed), isolada do coral *Discosoma striata* (MATZ *et al.*, 1999) é outro marcador bastante utilizado, cuja fluorescência é intensa, podendo ser diferenciada do GFP quando expressos simultaneamente (ADELMAN *et al.*, 2008).

Eckert *et al.* (2005) transformaram com eficiência quatro fungos patogênicos, via *A. tumefaciens*, com os genes *Dsred* (proteína vermelha fluorescente) e *gfp* para avaliar a colonização e os sintomas das doenças. *Leptosphaeria maculans* e *L. biglobosa* causam doença em canola, e *Oculimacula yallundae* e *O. acuformis* causam doenças em cereais, ou seja, as doenças são causadas pela associação de duas espécies, o que dificulta os estudos de interação. Assim, a transformação permitiu o conhecimento molecular da doença com avaliação da interação com a planta.

O fungo *Trichoderma harzianum*, comumente encontrado como saprófita de solo, foi transformado com um vetor contendo o gene *gfp* sob controle de um promotor constitutivo para avaliar a capacidade de colonizar endofiticamente tecidos das raízes de plantas de tomate (CHACÓN *et al.*, 2007). Fávaro (2009) introduziu o gene *gfp* no fungo endofítico da cana-de-açúcar *Epicoccum nigrum*, por meio da transformação mediada por *A. tumefaciens*, o que possibilitou o estudo da interação com essa planta, mostrando que este fungo coloniza endofiticamente a mesma. Romão (2010) obteve transformantes de *Trichoderma virens*,

expressando GFP, sendo possível observar que este fungo não promoveu alterações fenotípicas visíveis em plantas da cana-de-açúcar, colonizou predominantemente as raízes, onde formou camadas densas de micélio ao redor, antes de penetrar o espaço das primeiras camadas de célula da epiderme do tecido radicular.

Figueiredo e colaboradores (2010) descreveram um sistema de agrotransformação para o fungo *Guignardia citricarpa*, possibilitando a utilização de linhagens de transformantes em diferentes estratégias para o estudo de controle biológico e entendimento da interação planta-patógeno.

Desse modo, fica evidente a grande importância metodológica de transformação genética mediada por *A. tumefaciens* para fungos. Além disso, sistemas repórteres no estudo de interação fungo-planta tem grande potencial para revelar detalhes da relação simbiótica entre esses organismo e com isso, fornecer elementos para otimização das relações mutualísticas.

4 Capítulo I: *Colletotrichum gloeosporioides stricto sensu*: uma espécie endofítica ou patogênica em citros no Brasil?

Resumo

A Podridão Floral dos Citros (PFC) é causada pela infecção de flores por fungos da espécie *Colletotrichum acutatum* os quais produzem lesões marrom-alaranjadas nas pétalas de flores, acarretando a abscisão de frutos jovens e retenção de cálice. Recentemente alguns relatos demonstram que pelo menos algumas linhagens de *C. gloeosporioides lato sensu* também causam manchas marrons em pétalas. Entretanto, este complexo, após análise multigênica foi recentemente dividido em 22 espécies e uma subespécie, sendo apenas um pequeno grupo de isolados realmente pertencente à espécie *C. gloeosporioides stricto sensu*. Como este trabalho filogenético publicado em 2012 não incluía isolados provenientes de citros do Brasil, a real identidade dos isolados denominados de *C. gloeosporioides* que colonizam plantas cítricas no Brasil, de forma endofítica ou patogênica, não é conhecida. Ainda, na literatura não há relatos da presença de linhagens patogênicas de *Colletotrichum* de forma endofítica e também é desconhecido se está presente como patógeno latente em plantas cítricas ou em plantas da vegetação espontânea entre as floradas contribuindo como reservatório de inóculo para a disseminação da doença. O isolamento e identificação de fungos do gênero *Colletotrichum* colonizando o interior de plantas cítricas e da vegetação espontânea de pomares com relatos da doença pode dirimir tais dúvidas, servindo de base para a adoção de medidas de controle da doença. Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo isolar e identificar as espécies de *Colletotrichum* endofíticas de plantas cítricas e plantas da vegetação espontânea, identificar a espécie de isolados patogênicos provenientes de flores de citros; avaliar a especificidade dos *primers* espécie específicos para *C. gloeosporioides* e ainda avaliar a patogenicidade em flores de citros de isolados endofíticos de folhas de citros e da vegetação espontânea. A identificação foi realizada por meio de características morfológicas e moleculares por PCR, sequenciamento da região ITS1-5,8S-ITS2 do rDNA e parcial do genes 18S do rDNA; GPDH (glicerol 3-fosfato desidrogenase); actina(ACT), calmodulina (CAL) e quitina (CHS-1). Foram obtidos 189 isolados endofíticos, 120 de plantas cítricas e 69 de plantas da vegetação espontânea, identificados por PCR como pertencentes ao complexo de espécies *C. gloeosporioides* e por análise multigênica identificados como sendo da espécie *C. gloeosporioides stricto sensu*. A análise multigênica revelou também a existência de grande variabilidade genética entre os isolados analisados, sem entretanto apresentar suporte para a separação em nova espécie. Os isolados previamente descritos como patogênicos em citros (LIMA *et al*, 2011) foram também identificados como *C. gloeosporioides stricto sensu*. Desta forma, a espécie *Colletotrichum gloeosporioides stricto sensu* coloniza de forma endofítica plantas cítricas e também contribui para a epidemiologia da podridão floral em citros no Brasil. Por outro lado, a espécie *C. acutatum* parece não colonizar de forma endofítica as plantas cítricas ou da vegetação espontânea investigadas. Os *primers* disponíveis na literatura para identificação de *C. gloeosporioides* são capazes de amplificar diferentes espécies deste complexo e portanto não podem ser utilizados para identificar *C. gloeosporioides stricto sensu*. O teste de patogenicidade revelou

que isolados de *C. gloeosporioides* endofíticos de citros são capazes de causar sintomas da PFC em flores de citros. O sequenciamento multigênico de isolados causadores de PFC em folhas de citros, revelou que tais isolados pertencem a espécie *C. gloeosporioides stricto sensu*. Assim, conclui-se que ao contrário de *C. acutatum*, a espécie *C. gloeosporioides stricto sensu* coloniza endofiticamente plantas de citros e da vegetação espontânea e participa da epidemiologia da doença PFC em pomares cítricos do Estado de São Paulo, Brasil.

Palavras-chave: *Colletotrichum acutatum*, *Colletotrichum gloeosporioides*; fungo endofítico de citros, vegetação espontânea, Reação em cadeia da polimerase (PCR), sequenciamento multigênico.

Chapter I: *Colletotrichum gloeosporioides* stricto sensu: an endophytic species or citrus pathogens in Brazil?

Abstract

Postbloom Fruit Drop (PFD) of citrus is caused by the infection of the flowers by the fungus *Colletotrichum acutatum*, which produce brownish orange lesions in the petals, causing the abscission of young fruitlets and the retention of the calyces. Recently, certain reports demonstrate that at least some strains of *C. gloeosporioides lato sensu* also cause brown stains in petals. However, this complex, after multigenic analysis was recently divided in 22 species and one subspecies, having only one small group of isolates actually belonging to the species *C. gloeosporioides stricto sensu*. Since this phylogenetic study published in 2012 did not include isolates originating from Brazil, the real identity of the isolates denominated *C. gloeosporioides*, which colonized citric plants in Brazil in an endophytic or pathogenic way, is unknown. Still, in literature there are no records of pathogenic strains of *Colletotrichum* in endophytic form and it is also unknown if it is present as a latent pathogen in citric plants or in plants of the spontaneous vegetation in between blooms, contributing as a reservoir of inoculum for the dissemination of the disease. The isolation and identification of the fungi of the genus *Colletotrichum* colonizing the interior of citric plants and in the spontaneous vegetation of orchards with records of the disease could nullify these doubts, serving as a base for the adoption of means for the control of the ailment. Hence, this study has as its objective to isolate and identify the endophytic species of *Colletotrichum* of citric plants and spontaneous vegetation; identify the species of pathogen isolates originating from citrus flowers; estimate the specificity of the species-specific primers for *C. gloeosporioides* and assess the degree of pathogenicity in citric flowers of endophytic isolates and in citric leaves and spontaneous vegetation. The identification was carried out using morphologic and molecular characteristics by PCR, sequencing of the region ITS1-5, 8S-ITS2 of the rDNA and partial sequencing of the 18S genes of the rDNA; GPDH (glycerol 3-phosphate dehydrogenase); actin (ACT), calmodulin (CAL) e chitin (CHS-1). 189 endophytic isolates were obtained, 120 from citric plants and 69 from plants of the spontaneous vegetation, identified with PCR as part of the complex of the species *C. gloeosporioides*, and by multigenic analysis as *C. gloeosporioides stricto sensu*. The multigenic analysis also revealed the existence of a wide genetic variability between the isolated which were analyzed, however without presenting enough support for its separation in a new species. The isolates previously described as citrus pathogens (LIMA *et al*, 2011) were also identified as *C. gloeosporioides stricto sensu*. This way, the species *Colletotrichum gloeosporioides stricto sensu* colonizes citric plants in an endophytic way and contributes for the epidemiology of the postbloom fruit drop in Brazil. On the other hand, *C. acutatum* does not seem to colonize the citric plants and spontaneous vegetation investigated in an endophytic form. The primers that were available in literature for the identification of *C. gloeosporioides* are capable of amplification of different species of this complex and therefore cannot be used for the identification of *C. gloeosporioides stricto sensu*. The pathogenicity test revealed that the citrus endophytic isolates of *C. gloeosporioides* are capable of causing symptoms of PFD in citric flowers. The

multigenic sequencing of the isolates that cause PFD in citric flowers revealed that these isolates belong to the species *C. gloeosporioides stricto sensu*. Hence, it is concluded that contrary to *C. acutatum*, *C. gloeosporioides stricto sensu* colonizes citric plants and the spontaneous vegetation in endophytic form, participating in the epidemiology of the disease PFD in citric orchards of the São Paulo state, in Brazil.

Key words: *Colletotrichum acutatum*, *Colletotrichum gloeosporioides*; endophytic fungus of citrus, spontaneous vegetation, Polymerase Chain Reaction (PCR), multigenic sequencing.

4.1 Introdução

A Podridão Floral dos Citros (PFC) é uma das doenças mais severas de citros da região sudeste, no Estado de São Paulo - Brasil. Essa doença caracteriza-se pela formação de lesões alaranjadas em pétalas, lesões necróticas em estigmas com a retenção de cálices e a queda prematura de frutos (Feichtenberger, 2005).

A causa da PFC foi originalmente atribuída ao fungo *Colletotrichum gloeosporioides* (Fagan, 1979). Posteriormente Brown, Sreenivasaprasad e Timmer (1996) em estudo utilizando marcador molecular com a amplificação da região ITS1 do DNA ribossomal, através da PCR com os *primers* específicos para *C. acutatum* e para *C. gloeosporioides*, constataram que o agente responsável pela doença é o fungo *C. acutatum*. Pesquisa com fungos isolados de flores de citros apresentando sintomas de PFC demonstrou que os isolados analisados pertenciam a espécie *C. gloeosporioides*. Testes de patogenicidade e comparações do desenvolvimento da doença por *C. acutatum* e *C. gloeosporioides* indicaram *C. gloeosporioides* novamente como um dos agentes epidemiológicos da PFC (Lima *et al.*, 2011).

O aumento do uso de abordagens como a filogenia molecular para caracterizar a diversidade de espécies de *Colletotrichum* (Mills *et al.*, 1992, Du *et al.*, 2005), o uso de filogenia multilocus e o conceito filogenético de espécie (Taylor *et al.*, 2000) vem se tornando componentes integrais do estudo da sistemática em fungos (Guerber *et al.*, 2003; Crouch *et al.*, 2006; Crouch *et al.*, 2009; Damm *et al.*, 2009, 2012a, 2012b; Weir *et al.*, 2012).

Desta forma, métodos moleculares como PCR e sequenciamento de DNA são ferramentas que vem sendo utilizadas na diferenciação das espécies do gênero *Colletotrichum*.

A ocorrência dessa doença em locais sem histórico da PFC, além da característica explosiva de epidemias tem intrigado produtores e pesquisadores, principalmente no que se refere à origem do inóculo inicial. Há relato acerca da sobrevivência de *C. acutatum* em plantas cítricas, em que os apressórios do fungo permanecem na superfície das folhas entre as floradas, originando conídios pelo estímulo de exsudados florais (Zulfiqar, 1996). No entanto, essa hipótese não explicaria a ocorrência de severas epidemias em pomares isentos da doença.

Não há relatos na literatura da presença de linhagens patogênicas de *Colletotrichum* de forma endofítica, se o fungo está presente como patógeno

latente em plantas cítricas entre as floradas ou mesmo em plantas da vegetação espontânea em pomares cítricos, contribuindo como reservatório de inóculo para a disseminação da doença. Assim, o isolamento e identificação de fungos do gênero *Colletotrichum* colonizando o interior de plantas cítricas e de plantas da vegetação espontânea de pomares com histórico da PFC pode auxiliar a esclarecer tais dúvidas, que servirão de base para a adoção de medidas de controle da doença.

No trabalho de Lima (2011), por meio de isolamento de fungos presentes em flores com sintoma de PFC e subsequente realização de teste de patogenicidade destes isolados, pode verificar que o fungo *Colletotrichum gloeosporioides* foi capaz de desenvolver sintoma da doença PFC nas flores testadas.

Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi verificar quais espécies de *Colletotrichum* ocorrem de forma endofítica em plantas de citros e plantas da vegetação espontânea no Estado de São Paulo, Brasil; avaliar a especificidade do par de *primers* CgInt/ITS4 na identificação de isolados de *C. gloeosporioides* e realizar avaliação dos isolados em teste de patogenicidade em flores de citros, utilizando metodologia de isolamento de endófitos, e o emprego de características morfológicas e moleculares por meio de PCR e sequenciamento da região ITS1-5,8S-ITS2 do rDNA e parcial do genes 18S do rDNA; GPDH (glicerol 3-fosfato desidrogenase); actina(ACT), calmodulina (CAL) e quitina (CHS-1) para identificação em nível de espécie.

4.2 Materiais e Métodos

4.2.1 Isolamento de Fungos

Os isolados fúngicos foram obtidos de folhas saudáveis de 120 plantas cítricas e de diversas plantas da vegetação espontânea de pomares com sintomas de PFC. Foram realizadas coletas em 60 plantas de dois pomares para obtenção de isolados de plantas cítricas, localizados nos municípios de Mogi Guaçu e Barretos no Estado de São Paulo, Brasil, nos meses de Janeiro e Fevereiro de 2009. Pomares com plantios de 1994 e 1999 de laranja Valência enxertada sobre limão Cravo. Os isolados da vegetação espontânea foram obtidos nos meses de

junho e novembro de 2008, do município de Rincão também no Estado de São Paulo.

A metodologia utilizada para o isolamento dos microrganismos endofíticos foi a descrita por Petrini (1986). Seis fragmentos de 5-7 mm de cada folha de citros analisada foram transferidos para duas placas de Petri contendo meio BDA pH 6,8 com tetraciclina a 100 µg.mL⁻¹, incubadas a 28°C. Após crescimento dos isolados, todos foram analisados sob microscopia e aqueles que apresentaram características morfológicas do gênero *Colletotrichum* foram submetidos ao cultivo monospórico pelo espalhamento com alça de Drigalski de 0,1 mL de suspensão de conídios, na concentração de 10³. mL⁻¹, em placa de Petri com meio BDA pH 6,8 e incubadas a 28°C por 24 horas. A germinação de conídios foi observada sob microscópio estereoscópico e apenas um único conídio germinado foi removido e transferido para uma nova placa de Petri com meio BDA.

4.2.2 Caracterização Morfológica

A metodologia utilizada foi a descrita por Weir e colaboradores (2012), utilizando discos de micélios de 10mm de diâmetro transferidos para o centro de placas de Petri contendo meio BDA Difco por 10 dias sob luz branca e luz U.V.sendo 12h claro/12h escuro.

4.2.3 Caracterização Molecular

4.2.3.1 Extração de DNA

Os isolados foram cultivados por 3 dias em placa de Petri contendo meio BDA pH 6,8 sob temperatura de 28°C, sob luz contínua. O micélio foi coletado e o DNA genômico foi obtido utilizando o Microbial DNA Isolation Kit (12224-5 - Mo Bio Laboratories) de acordo com as instruções do fabricante.

4.2.3.2 Identificação por PCR

Para identificação molecular pela técnica de PCR, foi utilizado o *primer* universal ITS4 (5' – TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC – 3') (White *et al.*, 1990) em conjunto com *primer* Calnt (5' – GGG GAA GCC TCT CGC GG - 3') (Sreenivasaprasad *et al.*, 1996), Cglnt (5' – GGC CTC CCG CCT CCG GGC GG- 3') (Mills *et al.*, 1992) e Col1 (5' – GCC GTC CCC TGA AAA G – 3') (Pileggi *et al.*, 2009) específicos para o Complexo de espécies *C. acutatum* *C. gloeosporioides* e *C. boninense*, amplificando fragmentos de 490, 450 e 520 pares de bases respectivamente.

As reações foram realizadas com 25 µL de solução, em água ultrapura, contendo 2 µL de DNA extraído e quantificados na concentração 10ng/µL, 2,5 µL de tampão 10X para PCR, 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de uma mistura de dNTP, 0,5 µM de cada um dos primers e 0,5 U Taq DNA polimerase (Invitrogen®).

As amplificações foram realizadas em termociclador Eppendorf® (Modelo: Mastercycler Gradient), para Cglnt/ITS4 e Calnt/ITS4 com uma desnaturação inicial por um período de 5 minutos a 95°C, seguido por um ciclo de 30 segundos a 94°C, 45 segundos a 62°C, 90 segundos a 72°C, um ciclo de 30 segundos a 94°C, 45 segundos a 60°C, 90 segundos a 72°C, seguidos por 33 ciclos de 30 segundos a 94°C, 45 segundos a 58°C e 90 segundos a 72°C com uma extensão final por um período de 3 minutos a 72°C. E a reação para Col1/ITS4 com desnaturação inicial por um período de 5 minutos a 95°C, seguido por 40 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos 58°C, 90 segundos a 72°C com uma extensão final por um período de 3 minutos a 72°C.

Após a amplificação, os produtos de PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão TBE juntamente com o marcador de peso molecular de 100 pb DNA Ladder (Invitrogen®). A corrida eletroforética foi realizada a corrente constante de 3 volts/cm por 2 horas. As bandas de amplificação foram coradas com GelRed e visualizadas em transiluminador ultravioleta e fotodocumentadas.

Foi realizada análise *in silico* com base no alinhamento de sequências multigênicas deste trabalho juntamente com as depositadas no TreeBase (www.treebase.org) número de estudo: S12535 (Weir *et al.*, 2012) para avaliar a

especificidade do par de *primers* CgInt/ITS4 para a espécie *C. gloeosporioides stricto sensu*.

4.2.3.3 Identificação por Sequenciamento

Inicialmente foi realizado uma seleção dos isolados de *Colletotrichum* sp provenientes de citros e da vegetação espontânea utilizando sequências 18S e ITS1-5,8S-ITS2 do rDNA e parcial do gene GPDH.

A partir dos dados obtidos, foram selecionados 8 isolados de citros (LGMF 501, 504, 507, 514, 518, 521, 524, 540) e 8 isolados da vegetação espontânea (LGMF 746, 747, 748, 749, 750, 751, 757, 800) para terem sequenciadas as seis regiões gênicas avaliadas: 18S e ITS1-5,8S-ITS2 do rDNA, GPDH, CAL, ACT e CHS-1.

Para o sequenciamento, as reações foram realizadas com pares *primers* para cada região a ser amplificada como mostra a tabela 1. Para cada amplificação foi realizada reação de PCR com um volume total de 12,5 µL solução, em água ultrapura contendo 1,25 µL de tampão 10X para PCR, 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de uma mistura de dNTP, 0,2 µM de cada primer, 20 ng de DNA extraído e 1,25 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen®).

A amplificação para a região 18S e IT1-5,8S-ITS2 do rDNA foi realizada com desnaturação inicial a 94° C por 5 minutos; 35 ciclos de 30 segundos a 94°C, 50 segundos a 55°C, 2 minuto a 72°C; seguida de extensão final de 5 minutos a 72°C.

A amplificação parcial do gene GPDH foi realizada com desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos; 30 ciclos de 60 segundos a 95°C, 60 segundos a 56°C, 1 minuto a 72°C; seguida de extensão final de 5 minutos a 72°C.

As amplificações parciais dos genes actina (ACT), quitina (CHS-1) e calmodulina (CAL) foram realizadas como descrito em Weir *et al.* (2012).

TABELA1 – PAR DE *PRIMERS* PARA CADA REGIÃO SEQUENCIADA

Gene	Primer	Direção	Sequência (5'-3')	Referência
ACT	ACT-512F	Forward	ATG TGC AAG GCC GGT TTC GC	Carbone & Kohn 1999
	ACT-783R	Reverse	TAC GAG TCC TTC TGG CCC AT	Carbone & Kohn 1999
CAL	CL1C	Forward	GAA TTC AAG GAG GCC TTC TC	Weir <i>et al.</i> , 2012
	CL2C	Reverse	CTT CTG CAT CAT GAG CTG GAC	Weir <i>et al.</i> , 2012
CHS-1	CHS-79F	Forward	TGG GGC AAG GAT GCT TGG AAG AAG	Carbone & Kohn 1999
	CHS-345R	Reverse	TGG AAG AAC CAT CTG TGA GAG TTG	Carbone & Kohn 1999
GPDH	Gpd1-LM	Forward	ATTGGCCGCATCGTCTTCCGCAA	Myllys <i>et al.</i> , 2002
	Gpd2-LM	Reverse	CCCACTCGTTGTCGTACCA	Myllys <i>et al.</i> , 2002
18S e ITS	V9G	Forward	TTA CGT CCC TGC CCT TTG TA	de Hoog & Gerrits van den Ende, 1998.
	LS266	Reverse	GCA TTC CCA AAC AAC TCG ACT C	Gerrits van den Ende and de Hoog, 1999.

Para a purificação da reação de PCR, foram adicionados 7 µL de acetato de amônio 7,5 M e 60 µL de etanol absoluto Merck®. Após suave homogenização, as amostras foram colocadas em gelo por 1 hora e centrifugadas por 10 minutos a 13000 rpm a 25°C, descartando o sobrenadante. O *pellet* foi então lavado com 100 µL de etanol Merck® 70% recém preparado, centrifugado a 13000 rpm por 10 minutos seguido de secagem *overnight*. O produto purificado foi então ressuscitado em 13 µL de água ultrapura. O produto da PCR purificada foi então visualizado e quantificado em gel de agarose 1,5% (p/v), como descrito acima.

Para reação de sequenciamento foram utilizadas de 50 ng do produto de PCR purificado, 0,25 µM de *primer*, 2 µl da mistura para sequenciamento ET (kit: DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit for MegaBACE da

Amersham Biosciences®) e água ultrapura quando necessária para completar o volume final de 10 µl. As mesmas condições da reação de sequenciamento foram aplicadas para todos os *primers* e a amplificação foi realizada seguindo desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos; 35 ciclos de 20 segundos a 94°C, 15 segundos a 50°C e 1 minutos a 60°C.

As reações de sequenciamento foram purificadas com Sephadex™ G-50 *Fine DNA Grade*, e submetidas à eletroforese em Sequenciador Automático de DNA modelo MegaBACE (Amersham Biosciences®).

A edição e o alinhamento das sequências obtidas foi realizado com auxílio dos programas BioEdit 7.0.5.3 (HALL, 2001) e MEGA 5.1 (KUMAR *et al.*, 2008). A análise de máxima verossimilhança foi realizada pelo software GARLI (<http://www.molecularrevolution.org>) e a inferência Bayesiana pelo software MrBayes v.3.2.1 (RONQUIST *et al.*, 2012). A consistência dos nós obtidos foi avaliada pelo procedimento de *bootstrap* (FELSENSTEIN, 1985) com 2000 reamostragens. Para as análises baseadas em máxima verossimilhança e inferência Bayesiana, diferentes modelos evolutivos foram comparados utilizando-se o software ModelTest versão 3.7 (POSADA e CRANDALL, 1998).

Foram utilizadas como referência linhagens disponíveis no *Genbank* e *treeBase* (S12535). Como grupo externo foi utilizada linhagem de *C. boninense* ICMP17904 e *C. hippeastri* ICMP17920, também disponíveis no *Genbank*.

Para a visualização da estrutura tridimensional formada a partir da sequência parcial do gene 18S, foi utilizado o software MiRDeep (FRIEDLANDER *et al.*, 2012).

4.2.4 Teste de Patogenicidade

O teste de patogenicidade foi realizado com flores de plantas de citros de laranja Valência, saudáveis, mantidas em casa de vegetação as quais receberam spray de 25 mL de suspensão conidial a 10^5 . mL⁻¹, cobertos com sacos plásticos e mantidos umedecidos por 48 horas, controles negativos receberam *spray* de água destilada e um controle positivo de *C. acutatum* (Ca-142- Fundecitrus) foi utilizado, recebendo o mesmo tratamento, todos analisados com 4 repetições. A avaliação

dos sintomas foi diária, por 15 dias, para a visualização dos sintomas da doença (LIMA *et al.*, 2011).

Foram testados os mesmos isolados de plantas de citros e da vegetação espontânea selecionados para o sequenciamento multigênico.

4.3 Resultados

4.3.1 Isolados

O número total de fungos endofíticos isolados de folhas de citros dos pomares de Mogi-Guaçu e Barretos analisados foi de 368 e 383, sendo a frequência de isolamento de 1,53 e 1,59, respectivamente. As plantas da vegetação espontânea num total 188 isolados endofíticos com frequência de isolamento de 1,04.

Sendo selecionados para análise 189 fungos endofíticos, 120 isolados de folhas de plantas cítricas e 69 isolados de plantas da vegetação espontânea. Foram analisadas 60 folhas de citros de cada pomar, obtidos de 60 plantas diferentes, desta forma cada isolado de citros foi obtido de uma planta. Os isolados receberam identificação por sequência numérica. Assim, isolados LGMF 501 até LGMF 560 foram obtidos do pomar de Mogi Guaçu e isolados LGMF 561 até LGMF 620 do pomar de Barretos.

Os isolados da vegetação espontânea foram obtidos de diferentes plantas da vegetação espontânea, como apresentado na tabela 2.

TABELA 2 – NOMES DOS ISOLADOS OBTIDOS DAS ESPÉCIES DE PLANTAS DA VEGETAÇÃO ESPONTÂNEA

Isolado da Vegetação Espontânea	Planta da Vegetação Espontânea
LGMF 746	<i>Acanthospermum australe</i>
LGMF 786/787/810/811/812/813	<i>Beldroega (Portulaca oleracea)</i>
LGMF 753/762	<i>Brachiaria (Brachiaria sp)</i>
LGMF 769/770/771/772 /793/794/795/796	<i>Buva (Conyza bonariensis)</i>
LGMF 745/765/789	<i>Capim Coloninho (Echinochloa colonum)</i>

LGMF 774/775/798/799	Capim Sempre verde (<i>Panicum maximum</i>)
LGMF 747/750/756/757/758/776/800	Carrapicho Arroz Bugre (<i>Amaranthus deflexus</i>)
LGMF 766/767/790/791	Erva de Santa Luzia (<i>Chamaesyce hirta</i>)
LGMF 751/768/792	Falsa Serralha (<i>Emilia sonchifolia</i>)
LGMF 748/749/783/784/785 /807/808/809	Guanxuma (<i>Sida rhombifolia</i>)
LGMF 763/764/788	Pé-de-Galinha (<i>Eleusine indica</i>)
LGMF 752/773/797	Picão-Preto (<i>Bidens pilosa</i>)
LGMF 754/755/759/777/778/779/ 780/781/782/801-806	Trapoeiraba (<i>Commelina benghalensis</i>)
LGMF 760/761	Vassoura (<i>Sida</i> sp)

4.3.2 Caracterização Morfológica

Todos os 120 isolados endofíticos de folhas de citros e os 69 isolados de plantas da vegetação espontânea foram identificados como pertencentes ao gênero *Colletotrichum* de acordo com suas características morfológicas e culturais (Sutton, 1992).

Os valores médios de diâmetro da colônia de 5,75 cm, largura do conídio de 4,07 μ m e comprimento de conídio de 12,6 μ m foram comparados aos dados obtidos por Weir *et al.*, (2012) e desta forma confirmando pertencerem à espécie *Colletotrichum gloeosporioides stricto sensu*.

4.3.3 Identificação por PCR

Os 189 isolados foram analisados por PCR para identificar os complexos de espécies a que pertenciam e todos amplificaram um fragmento de 450 pb com o par de *primers* CgInt/ITS4, sendo identificados como pertencentes ao complexo de espécies *C. gloeosporioides* e não amplificaram com os pares CaInt/ITS4 e Col1/ITS4, os quais amplificariam para os complexos de espécies *C. acutatum* e *C. boninense* respectivamente. Sendo utilizadas linhagens referência para *C. boninense* (MAFF 305972, MAFF 306094 e MAFF 306204), *C. gloeosporioides* (Man-76 e Pass 103) e *C. acutatum* (Ca – 142 Fundecitros). Dessa forma, os 189

isolados foram identificados como pertencentes ao complexo de espécies *C. gloeosporioides*.

4.3.4 Identificação por sequenciamento

O sequenciamento da região ITS1-5,8S-ITS2 do rDNA juntamente com a sequência parcial do gene 18S e GPDH permitiu a diferenciação dos isolados em dois grupos distintos. Cada grupo apresentando isolados de plantas de citros e da vegetação espontânea. Grupo 1 com 38 isolados de citros (13 Mogi-Guaçu, 25 Barretos) e 15 da vegetação espontânea; grupo 2 com 82 isolados de citros (47 Mogi Guaçu e 35 Barretos) e 54 da vegetação espontânea, como apresentado na figura 1.

A distinção entre os dois grupos se baseia principalmente numa região de 22 nucleotídeos presentes no último exon do gene 18S do rDNA (Figura 2A). Através da análise dessa região de variação pelo software MiRdeep (2008), é possível verificar que a alteração de nucleotídeos dessa região é responsável por uma

variação na sequência de ribonucleotídeos do ribossomo e assim alterando sua conformação como apresentado na figura 2B 2C.

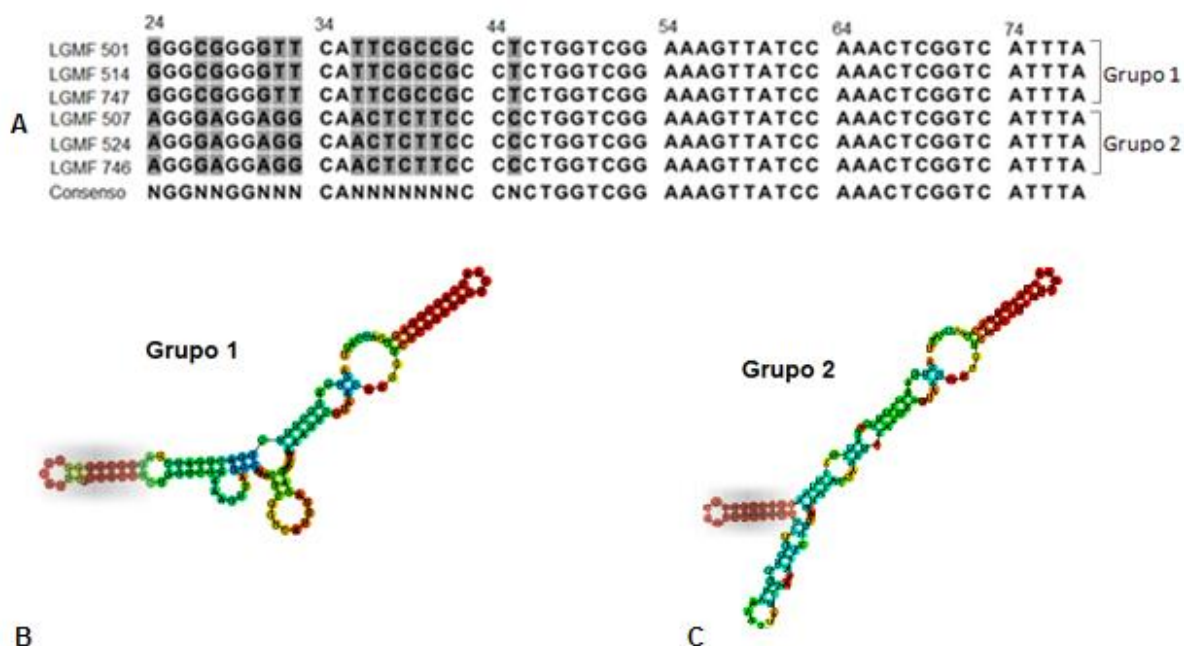


Figura 2 – A: Região de variação de 22 nucleotídeos no último exon do gene 18S do rDNA *Colletotrichum gloeosporioides* dos Grupos 1 e 2. B e C: Conformação do RNA ribossômico gerado pela variação no último exon do gene 18S dos grupos 1 e 2 respectivamente.

O alinhamento multigênico das sequências combinadas das seis regiões analisadas (ITS, 18S, GPDH, ACT, CHS-1 e CAL) de 8 isolados de citros (LGMF 501, 504, 507, 514, 518, 521, 524, 540), e 8 isolados da vegetação espontânea (LGMF 746, 747, 748, 749, 750, 751, 757, 800), juntamente com os 158 isolados de Weir *et al.*, (2012) (TreeBase S12535) e ainda 9 isolados de *C. gloeosporioides* causadores de sintomas da PFC em citros (FDC 6, 7, 9, 12, 15, 17, 23, 33, 83) (LIMA *et al.*, 2011) permitiu identificar todos os isolados analisados como pertencentes à espécie *Colletotrichum gloeosporioides stricto sensu*, como apresentado na figura 3.

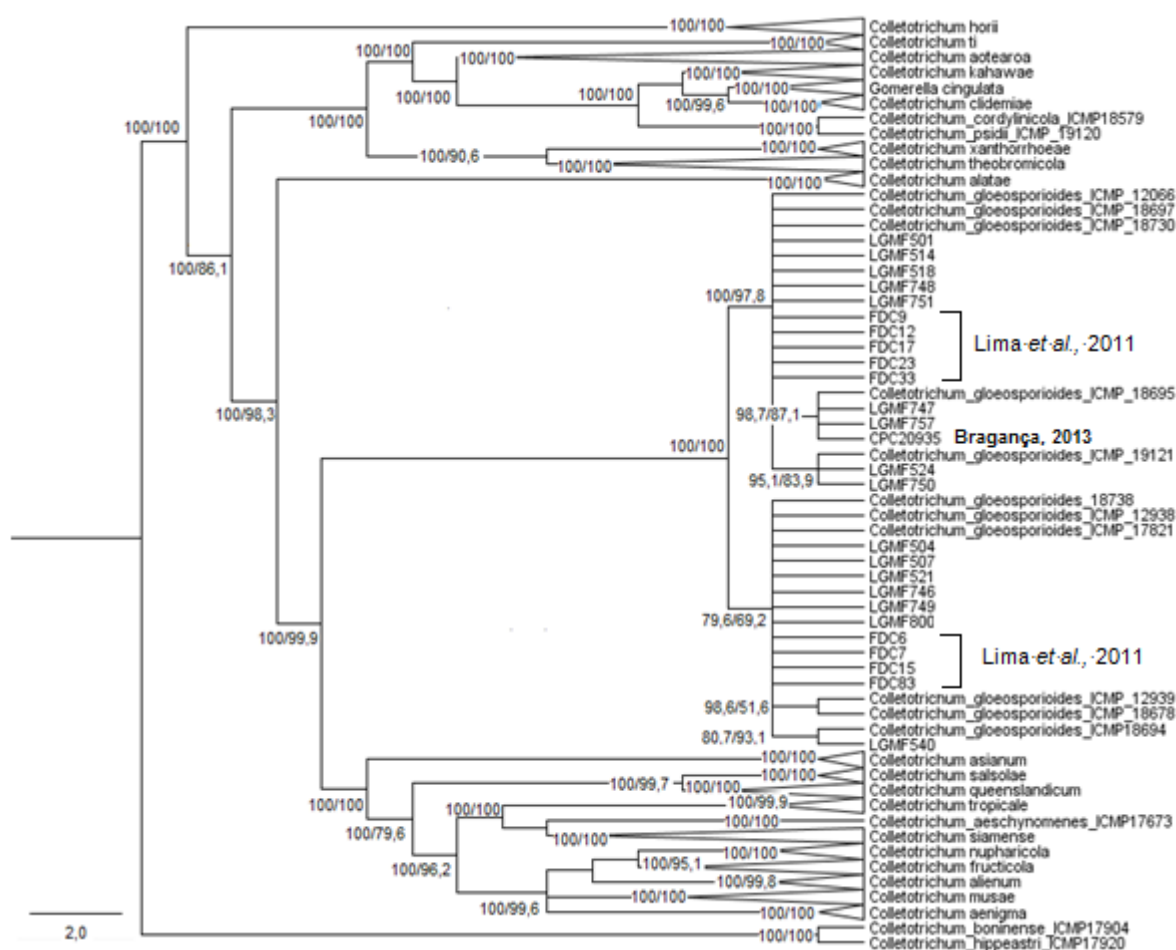


Figura 3 – Árvore filogenética do alinhamento multigênico das sequências dos genes ACT, CAL, CHS-1, GPDH, 18S e ITS1-5,8S-ITS2 do rDNA. Os valores de suporte estão apresentados a esquerda dos nós, sendo os valores de *bootstrap* de Máxima Verossimilhança e probabilidade *a posteriori* da Inferência Bayesiana apresentados nesta ordem.

As sequências geradas de cada um dos isolados foi depositada no GenBank como apresentado na tabela 3.

TABELA 3 – Código de acesso pelo GenBank dos isolados utilizados.

Isolado / gene	Actina	β -tubulina	Calmodulina	GPDH	18S-ITS	Quitina
LGMF 501	KJ569179	KJ579716	KJ579905	JQ580768	JQ580587.1	KJ579921
LGMF 504	KJ569180	KJ579719	KJ579906	JQ580771	JQ580590	KJ579922
LGMF 507	KJ569181	KJ579722	KJ579907	JQ580774	JQ580593	KJ579923
LGMF 514	KJ569182	KJ579729	KJ579908	JQ580781	JQ580600	KJ579924

LGMF 518	KJ569183	KJ579733	KJ579909	JQ580785	JQ580604	KJ579925
LGMF 521	KJ569184	KJ579736	KJ579910	JQ580788	JQ580607	KJ579926
LGMF 524	KJ569185	KJ579739	KJ579911	JQ580791	JQ580610	KJ579927
LGMF 540	KJ569186	KJ579755	KJ579912	JQ580807	JQ580626	KJ579928
LGMF 746	KJ569187	KJ579837	KJ579913	JQ580707	JQ580526	KJ579929
LGMF 747	KJ569188	KJ579838	KJ579914	JQ580708	JQ580527	KJ579930
LGMF 748	KJ569189	KJ579839	KJ579915	JQ580709	JQ580528	KJ579931
LGMF 749	KJ569190	KJ579840	KJ579916	JQ580710	JQ580529	KJ579932
LGMF 750	KJ569191	KJ579841	KJ579917	JQ580711	JQ580530	KJ579933
LGMF 751	KJ569192	KJ579842	KJ579918	JQ580712	JQ580531	KJ579934
LGMF 757	KJ569193	KJ579848	KJ579919	JQ580718	JQ580537	KJ579935
LGMF 800	KJ569194	KJ579891	KJ579920	JQ580737	JQ580540	KJ579936

Pela análise do sequenciamento multigênico, verificou-se que o *primer* CgInt (5' - GGC CTC CCG CCT CCG GGC GG - 3') utilizado em metodologia de PCR para identificação de isolados como *C. gloeosporioides*, não é espécie específico, uma vez que pode amplificar em diferentes espécies do complexo *C. gloeosporioides*. A sequência do *primer* CgInt está presente em espécies do complexo *C. gloeosporioides* como: *C. aeshynomenes*, *C. fructicola*, *C. siamense* e *C. gloeosporioides* (Figura 4). Desta forma, um isolado que amplifique com a utilização deste *primer*, não terá sua correta identificação em nível de espécie.

Sequência do primer CgInt	GGCCT--CCCG---CCTCCGGGCGG
JX010244.1 <i>Colletotrichum_aenigma</i>	CCTCCCGGCT--CCCG---CCCCGGGCGGG
JX010176.1 <i>Colletotrichum_aeshynomenes</i>	CCTCCCGGCT--CCCG---CCTCCGGGCGGG
JX010190.1 <i>Colletotrichum_alatae</i>	CCTCCCGGCT--CCCG---CCCCGGGCGGG
JX010217.1 <i>Colletotrichum_alienum</i>	CCTCCCGGCT--CCCG---CCCCGGGCGGG
JX010220.1 <i>Colletotrichum_aotearoa</i>	CCTCCCGGCT--CCCG---CCCCGGGCGGG
JX010192.1 <i>Colletotrichum_asianum</i>	ACTCCCGGCT--CCCG---CCCCGGGCGGG
JX010274.1 <i>Colletotrichum_clidemiae</i>	CCTCCCGGCT--CCCG---CCCCGGGCGGG
JX010166.1 <i>Colletotrichum_fructicola</i>	CCTCCCGGCT--CCCG---CCTCCGGGCGGG
JX010151.1 <i>Colletotrichum_gloeosporioides</i>	CCTCCCGGCT--CCCG---CCTCCGGGCGGG
GQ329687.1 <i>Colletotrichum_horii</i>	CCTCCCGGCT--CCCG---CCCCGGGCGGG
JX010230.1 <i>Colletotrichum_kahawae</i>	CCTCCCGGCT--CCCG---CCCCGGGCGGG
JX010143.1 <i>Colletotrichum_musae</i>	CCTCCCGGCT--CCCG---CCCCGGGCGGG
JX010189.1 <i>Colletotrichum_nupharicola</i>	CCTCCCGGCT--CCCG---CCCCGGGCGGG
JX010219.1 <i>Colletotrichum_psidii</i>	CCTCCCGGCT--CCCG---CCCCGGGCGGG
JX010276.1 <i>Colletotrichum_queenslandicum</i>	CCTCCCGGCT--CCCG---CCCCGGGCGGG
JX010242.1 <i>Colletotrichum_salsolae</i>	CCTCCCGGCT--CCCG---CCCCGGGCGGG
JX010163.1 <i>Colletotrichum_siamense</i>	CCTCCCGGCT--CCCG---CCTCCGGGCGGG
JX010266.1 <i>Colletotrichum_siamense</i>	CCTCCCGGCT--CCCG---CCCCGGGCGGG
JX010291.1 <i>Colletotrichum_theobromicola</i>	CCTCCCGGCT--CCCG---CCCCGGGCGGG
JX010267.1 <i>Colletotrichum_ti</i>	CCTCCCGGCT--CCCG---CCCCGGGCGGG
JX010275.1 <i>Colletotrichum_tropicale</i>	CCTCCCGGCT--CCCG---CCCCGGGCGGG
JX010261.1 <i>Colletotrichum_xanthorrhoeae</i>	CCTCCCGGCT--CCCG---CCCCGGGCGGG

Figura 4 – Espécies do Complexo de espécies *C. gloeosporioides* que apresentam sequência homóloga ao primer CgInt considerado espécie-específico.

4.3.5 Teste de Patogenicidade

O teste de patogenicidade realizado em plantas de citros com flores foram realizados com os mesmos isolados sequenciados, permitindo a identificação de um isolado de *C. gloeosporioides stricto sensu* (LGMF 514) endofítico de plantas de citros, causando sintomas de PFC, manchas marrons em flores, como mostra a figura 8.



Figura 5– Sintomas de PFC causado pelo isolado LGMF514 de *C. gloeosporioides*. Em A flor sadia, em B flor apresentando manchas marrons em suas pétalas (seta).

4.4 Discussão

Comparando as características morfológicas analisadas com as descritas por Sutton (1992) foi possível identificar todos os isolados como pertencentes ao gênero *Colletotrichum*.

Quando se analisou os dados de crescimento micelial no décimo dia em meio BDA Difco, comprimento e largura de conídio em comparação com os dados descrito por Weir *et al.*, (2012) foi possível a identificação de todos os isolados como pertencentes à espécie *C. gloeosporioides stricto sensu*.

A análise morfológica associada com o uso de ferramentas moleculares com abordagem de sequenciamento multilocus para estudo de filogenia (Guerber *et al.*, 2003; Crouch *et al.*, 2006; Crouch *et al.*, 2009; Damm *et al.*, 2009, 2011a, 2012b; Weir *et al.*, 2012), pode ser utilizada para a separação de espécies dentro de complexos de espécies. Como o trabalho de Weir e colaboradores (2012) que com a utilização de análise multilocus de isolados de diferentes regiões e culturas, identificados como pertencentes ao Complexo de espécies *C. gloeosporioides*, foram capazes de separar os isolados desse complexo em 22 espécies e uma

subespécie, com a utilização de sequências de cinco regiões do genoma: ITS, actina, calmodulina, GPDH e quitina.

Outros complexos de espécies como *C. acutatum* e *C. boninense* também foram estudados, ambos por Damm e colaboradores (2012a, 2012b, respectivamente). Para o complexo de espécies *C. acutatum*, uma análise multilocus utilizando ITS, actina, tubulina 2, quitina, GPDH e histona 3 puderam caracterizar esse complexo com a identificação de 31 espécies, destas 21 ainda não haviam sido descritas (Damm *et al.*, 2012a). No complexo de espécies de *C. boninense* foi possível identificar 18 espécies com a utilização de ITS, actina, tubulina 2, quitina, GPDH, calmodulina e histona 3 (Damm *et al.*, 2012b).

Desta forma, neste trabalho para a análise das características moleculares, primeiramente foi realizada uma comparação das sequências parciais dos genes GPDH e 18S juntamente com a região ITS1-5,8S-ITS2 do rDNA dos 189 isolados sequenciados, sendo possível identificar uma região variável de 22 nucleotídeos (Figura 2A), a qual provoca uma alteração na conformação do RNA ribossômico 18S por interação diferenciada entre seus ribonucleotídeos (Figura 2B/2C). A esta diferença entre os RNAs ribossômicos não foi possível realizar nenhuma inferência quanto a alteração de sua atividade na célula do fungo. No entanto, a presença de uma variação de 22 nucleotídeos em uma região responsável pela formação dos RNAs ribossômicos deve ter sua importância, até o momento ainda não claramente estabelecida.

Por meio de comparação das árvores de máxima verossimilhança e inferência Bayesiana dessas regiões gênicas analisadas, foi possível visualizar a formação de dois grupos distintos (Figura 1). Sendo dessa forma, escolhidos 8 isolados de cada um dos grupos formados, cada qual com 4 isolados de folhas citros e 4 de folhas da vegetação espontânea.

Estes 16 isolados selecionados tiveram as 5 regiões gênicas estudadas sequenciadas e foram comparadas com os isolados utilizados por Weir e colaboradores (2012) na separação de espécies dentro de complexos de espécies *C. gloeosporioides*. Nesta mesma análise, foram adicionados os 9 isolados causadores de sintoma de PFC em flores de citros (LIMA *et al.*, 2011), sendo possível identificar todos os isolados pertencentes à espécie *C. gloeosporioides stricto sensu* como mostra a figura 3. É possível ainda perceber

uma formação de subgrupos em *Colletotrichum gloeosporioides stricto sensu*, da mesma maneira como já apresentado por Weir e colaboradores (2012).

Uma vez que os isolados deste trabalho foram identificados pela técnica de PCR como pertencentes ao complexo de espécies *C. gloeosporioides* e por características morfológicas e sequenciamento multilocus para análise de filogenia como sendo da espécie *C. gloeosporioides stricto sensu*, a qual pertence a este complexo, pode-se inferir que a associação das análises morfológicas e moleculares são complementares para a identificação de espécies deste complexo.

Importante ressaltar que em ambas metodologias utilizadas, por características morfológicas e moleculares a espécie *C. acutatum* não foi identificada como endofítica das plantas de citros ou da vegetação espontânea, não se apresentou colonizando as folhas analisadas.

Ao realizar uma análise *in silico* do alinhamento das 5 regiões gênicas dos isolados utilizados por Weir *et al.* (2012), juntamente com as sequências deste trabalho, verificou-se que o *primer* CgInt, não identifica a espécie *C. gloeosporioides stricto sensu* e sim algumas espécies do complexo *C. gloeosporioides*. De modo que outras espécies já caracterizadas por Weir e colaboradores (2012), amplificam com este mesmo *primer* CgInt. Desta forma, não existe ainda um *primer* que possa ser utilizado para a precisa identificação da espécie *C. gloeosporioides stricto sensu*. Por outro lado, a utilização de sequenciamento multigênico apenas para identificação de isolados como pertencentes a esta espécie demanda tempo, elevado custo e grande conhecimento de filogenia. Devendo ainda serem desenvolvidos primers específicos para a identificação apenas por PCR para isolados da espécie *C. gloeosporioides stricto sensu*.

A metodologia de isolamento empregada é a indicada para o isolamento de fungos endofíticos, o que possibilita também o isolamento de fitopatógenos presentes de forma latente nestas plantas. Desta forma, é possível fazer uma comparação com outro patossistema importante também presente em citros, que envolve o fungo *Phyllosticta citricarpa* e *P. capitalensis*. Onde *P. citricarpa* é encontrada apenas em citros, e não está presente em outro tipo de hospedeiro, sendo dessa forma um patógeno específico. Diferente do que ocorre com *P. capitalensis* capaz de colonizar diferentes tipos de plantas, sendo um fungo cosmopolita, presente em diferentes hospedeiros. Fazendo-se uma correlação com

os resultados obtidos nesse trabalho é possível inferir que o fungo *C. gloeosporioides* tem um comportamento semelhante a *P. capitalensis*, sendo cosmopolita por estar presente em diferentes plantas, percebe-se isso com mais clareza quando se verifica a diversidade de plantas das quais foram isolados os fungos analisados por Weir e colaboradores (2012).

Os isolados provenientes de plantas da vegetação espontânea foram obtidos em maior quantidade das seguintes plantas: Trapoeraba, Guanxuma e Carrapicho. Desta forma, sugere-se que estas plantas sejam evitadas na plantação por estarem mais propensas a abrigarem o fungo *C. gloeosporioides stricto sensu* capaz de causar sintomas da doença PFC em flores de citros, Por outro lado, isolados de *C. acutatum*, não foram observados nestas mesmas plantas analisadas.

No teste de patogenicidade, um dos isolados avaliados foi capaz de causar mancha marrom em pétalas de flores, sintoma semelhante ao observado em campo, quando na presença da doença PFC. Tendo esse teste seguido as mesmas condições que as realizadas por Lima e colaboradores, (2011) que o fez com a utilização de isolados de flores com a presença de sintomas da PFC e verificando a árvore filogenética onde esses isolados também estão presentes, nota-se que ambos, os isolados de flores e os endofíticos do presente trabalho, pertencem a mesma espécie, sendo *Colletotrichum gloeosporioides stricto sensu*.

Os dados de Lima (2011), mostraram que os isolados foram obtidos de pétala, eles poderiam estar presente como oportunistas, ou não. Mas os isolados deste trabalho foram obtidos como endofíticos, já estavam dentro da planta, e ambos são da mesma espécie. Assim, em condições de inoculação e utilização de casa de vegetação, é possível em alguns casos, reproduzir sintoma de PFC. Mas o quanto esses isolados que estão colonizando de forma endofítica as plantas de citros e da vegetação espontânea, o quanto eles de fato irão contribuir para a disseminação da doença, isso ainda permanece a ser esclarecido.

4.5 Conclusão

A espécie *C. gloeosporioides stricto sensu* coloniza de forma endofítica plantas de citros e da vegetação espontânea analisadas;

A espécie *C. acutatum* não coloniza de forma endofítica as plantas analisadas;

Os *primers* descritos na literatura para identificação de isolados de *C. gloeosporioides* não são espécie-específicos, identificando outras espécies dentro com Complexo de espécies *C. gloeosporioides*.

A participação de isolados da espécie *Colletotrichum gloeosporioides stricto sensu* endofítico de citros na disseminação da doença PFC, ainda permanece não esclarecida.

Agradecimentos

Esta pesquisa teve suporte financeiro de CAPES e FAPESP.

4.6 Referências

ARCHIBALD, J. K.; MORT, M. E.; CRAWFORD, D. J. Bayesian inference of phylogeny: a non-technical primer. *Taxon* 52: 187–191.2003.

BALDASSARI, R. B.; WICKERT, E.; GOES, A. Pathogenicity, colony morphology and diversity of isolates of *Guignardia citricarpa* and *G. mangiferae* isolated from Citrus spp. European Journal of Plant Pathology, Netherlands, v. 120, p. 103-110. 2008.

BRAGANÇA, C. A. D. Molecular characterization of *Colletotrichum* spp associated with fruits in Brazil, Tese de doutorado, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.

BROWN, A.E.; SREENIVASAPRASAD, S.; TIMMER, L.W. Molecular characterization of slow-growing orange and key lime anthracnose strains of *Colletotrichum* from citrus as *C. acutatum*. *Phytopathology* 86(5):523-527.1996.

CARBONE, I.; KOHN, L. M. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia* 91: 553–556.1999.

CROUCH, J. A.; CLARKE, B.B.; HILLMAN, B.I. Unraveling evolutionary relationships among the divergent lineages of *Colletotrichum* causing anthracnose in turfgrass and corn. *Phytopathology* 96:46–60.2006.

CROUCH, J.A; TREDWAY, L.P.; CLARKE, B.B.; HILLMAN, B.J. Phylogenetic and population divergence correspond with habitat for the pathogen *Colletotrichum cereale* and allied taxa across diverse grass communities. *Molecular Ecology* 18:123–135.2009.

DAMM, U.; CANNON, P. F.; WOUDEMBERG, J. H. C.; CROUS, P. W. The *Colletotrichum acutatum* species complex. *Studies in Mycology*. 73:37-113. 2012a.

DAMM, U.; CANNON, P. F.; WOUDEMBERG, J. H. C.; JOHNSTON, P. R.; WEIR, B. S.; TAN, Y. P.; SHIVAS, R. G.; CROUS, P. W. The *Colletotrichum boninense* species complex. – *Stud. Mycol.* 73: 1–36. 2012b.

DE HOOG GS, GERRITS VAN DEN ENDE AHG. Molecular diagnostics of clinical strains of filamentous Basidiomycetes. *Mycoses* 41:183–189. 1998.

DU, M.; SCHARDL, C. L.; NUCKLES, E. M.; VAILLANCOURT, L. J. Using mating-type gene sequences for improved phylogenetic resolution of *Colletotrichum* species complexes. *Mycologia* 97:641–658.2005.

FAGAN, H.J. Postbloom fruit drop of citrus, a new disease of citrus associated with a form of *Colletotrichum gloeosporioides*. *Annual Applied Biology*, London, v.91, n.1, p.13-20, 1979.

FEICHTENBERGER, E.; BASSANEZI, R.B.; SPÓSITO, M.B.; BELASQUE Jr., J. Doenças dos citros. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. *Manual de Fitopatologia*. v.2. Editora Ceres, São Paulo. p. 239-269. 2005

FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *International Journal of Organic Evolution*, Lancaster, v.39, p.366-369, 1985.

GERRITS, V. D.; ENDE, A. H. G.; HOOG, G. S. DE. Variability and molecular diagnostics of the neurotropic species *Cladophialophora bantiana*. *Studies in Mycology* 43: 151–162. 1999.

GUERBER, J.C.; LIU, B.; CORRELL, J. Characterization of diversity in *Colletotrichum acutatum sensu lato* by sequence analysis of two gene introns, mtDNA and intron RFLPs, and mating compatibility. *Mycologia* 95(5) p. 872-895, 2003.

HALL, B. G. *Phlogenetic Trees Made Easy: A How-to Manual for Molecular Biologists*. Massachusetts U.S.A.: Sinauer Associates, Inc., 2001.

JELIHOVSCHI, E; FARIA, J.C; OLIVEIRA, S. The ScottKnott Clustering Algoritm. UESC, Ilheus, Brasil. 2009.

KALENDAR, R.; LEE, D.; SCHULMAN, A. H. Jafor PCR, in silico PCR and oligonucleotide assembly analysis. *Genomics*, 98(2): 137-144. 2011.

KUMAR S, DUDLEY J, NEI M & TAMURA K MEGA: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. 9: 299-306. 2008.

LIMA, W. G.; SPÓSITO, M. B.; AMORIM, L.; GONÇALVES, F.P.; FILHO, P. A. M. *Colletotrichum gloeosporioides*, a new causal agent of citrus post-bloom fruit drop. *European Journal of Plant Pathology*, v. 131, p. 157-165, 2011.

MILLS, P.R.; SREENIVASAPRASAD, S.; BROWN, A.E. Detection and differenciation of *Colletotrichum gloeosporioides* using PCR. *FEMS Microbiology Letters*. Amsterdam.v98.1/3p.137-144, 1992.

MYLLYS, L.; STENROOS, S.; THELL, A. New genes for phylogenetic studies of lichenized fungi: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and beta-tubulin genes. *Lichenologist* 34(4): 237–246, 2002.

PETRINI, O. Taxonomy of endophytic fungi of aerial plant tissues. *In* *Microbiology of the phyllosphere*. Edited by N.J. Fokkema and J. Van der Heuvel. Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp. 175- 197. 1986.

PETRINI, O. Fungal endophytes of tree leaves. *In*: ANDREWS, J. H.; HIRANO, S. S. (Eds.). *Microbial Ecology of Leaves*. New York: Springer-Verlag, p. 179-197. 1991.

PILEGGI, S.A.V.; OLIVEIRA, S.F.V.; WACULICZ-ANDRADE, C.E.; VICENTE, V.A.; DALZOTO, P.R.; CRUZ, G.K.; GABARDO, J.; MASSOLA, N.Jr.; TORRES, H.J. Jr.; PILEGGI, M.; KAVA-CORDEIRO, V.; GALLI-TERESAWA, L.V.; PIMENTEL, I.C.; GLIENKE, C. Molecular and Morphological Identification of *Colletotrichum gloeosporioides* and *Colletotrichum boninense* isolated from *Maytenus ilicifolia*, Canadian Journal of Microbiology, 55: 1076-1088. 2009.

POSADA, D.; CRANDALL, K. A. Modeltest: testing the model of DNA substitution. Bioinformatics, Oxford, v.14, n.9, p.817-818, 1998.

RONQUIST, F.; HUELSENBECK, J. P. MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. Bioinformatics v.19, p.1572-1574, 2003.

SILVA, F. A. S. E. & AZEVEDO, C. A. V. de. Versão do programa computacional Assistat para o sistema operacional Windows. Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais, Campina Grande, v.4,n.1, p71-78. 2002.

SILVA, F. A. S. E. AZEVEDO, C. A. V. de. A New Version of The Assistat-Statistical Assistance Software. In: World Congress On Computers In Griculture, 4, Orlando-FL-USA: Anais. Orlando: American Society of Agricultural Engineers, p.393-396, 2006.

SREENIVASAPRASAD, S., MILLS, P.R., MEEHAN, B. M., BROWN, A. E. Phylogeny and systematic of *Colletotrichum* species based on ribosomal DNA spacer sequences. Genome 39:499-512. 1996.

SUTTON, B.C. The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. In: *Colletotrichum* Biology, Pathology and Control (eds. J.A. Bailey and M.J. Jeger). CAB International, 1-26. 1992.

TAYLOR, J. W.; JACOBSON, D. J.; KROKEN. Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. Fungal Genetics and Biology, 31, 21–32.2000.

WEIR, B. S.; JOHNSTON, P. R.; DAMM, U. The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. – Stud Mycol. 73: 115–180.2012.

WHITE Jr., J. F.; MORROW, A. C. Endophyte-host associations in forage grasses. XII. A fungal endophyte of *Trichachne insularis* belonging to *Pseudocercospora*. Mycologia, 82, p.218-226, 1990.

WILCOX D.; DOVE B.; MCDAVID D.; GREER D.UTHSCSA. Image Tool. University of Texas. Health Science Centre, San Antonio. 2002.

ZULFIQAR, M.; BRLANSKY, R.H.; TIMMER, L.W. Infection of flower and vegetative tissues of citrus by *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides*. *Mycologia* 88(1): 121-128. 1996

5 CAPÍTULO II: RESISTÊNCIA DE *Colletotrichum gloeosporioides stricto sensu* A FUNGICIDAS BENZIMIDAZÓIS E MUTAÇÕES NO GENE DA β -*tubulina*

Resumo

A doença Podridão Floral dos Citros (PFC) é causada pelo fungo *Colletotrichum acutatum* e algumas linhagens de *C. gloeosporioides*. A principal medida de controle da PFC é a utilização de pulverizações com fungicidas durante o florescimento. Fungicidas benzimidazóis, como o carbendazim (Derosal 500[®]) são inibidores específicos, que ligados às moléculas de tubulina, impedem a formação dos microtúbulos nas divisões celulares, cessando o crescimento micelial e produção de esporos. Assim, o desenvolvimento de isolados resistentes é uma grande preocupação no manejo da doença. Mutações no gene β -*tubulina* como as que ocorrem nos códons 6, 50, 167, 198, 200 e 240 alteram a sequência de aminoácidos no sítio de ligação do benzimidazol causando resistência em fungos patogênicos. Os fungicidas triazóis, como o Nativo[®], são constituídos por Trifloxistrobina e Tebuconazol que inibem a cadeia respiratória e a biossíntese do ergosterol, importante componente da membrana celular. O objetivo deste estudo foi verificar a presença de linhagens de *C. gloeosporioides* provenientes de plantas cítricas e plantas da vegetação espontânea de pomares cítricos do Estado de São Paulo-Brasil quanto a resistência aos fungicidas dos grupos triazol e benzimidazol, e a associação desse com mutações no gene da β -*tubulina*. A presença de mutações foi avaliada pelo sequenciamento parcial do gene β -*tubulina*. A resistência ao fungicida carbendazim foi observada em 37 dos 120 isolados (30,8%) de plantas de citros, e 43 dos 69 isolados (62,3%) de plantas da vegetação espontânea. Todos os isolados resistentes de plantas cítricas foram provenientes de um mesmo pomar de citros com aplicação do fungicida há mais de 10 anos. Todos os isolados resistentes provenientes de plantas da vegetação espontânea se apresentaram altamente resistentes, indicando que a utilização prolongada de carbendazim gera isolados resistentes diminuindo sua efetividade no campo. Todos os 189 isolados de *C. gloeosporioides* avaliados apresentaram a mesma sequência para o gene da β -*tubulina*, não apresentando mutações nos códons 6, 50, 167, 198, 200 e 240 nos quais há relatos na literatura de mutação e associação com resistência a fungicidas benzimidazóis. Por outro lado, todos os isolados apresentaram mutações (SNP) nos códons 76, 80, 82, 169, 203 e 236, sem entretanto alterar o aminoácido na proteína tubulina resultante. Uma vez que tanto isolados resistentes quanto sensíveis apresentam tais SNPs, e elas não alterarem o aminoácido codificado, tais mutações não devem estar associadas a resistência observada nestes isolados. Se mutações em outras regiões do gene β -*tubulina* não analisadas são responsáveis por tal resistência ou se na espécie *C. gloeosporioides* a resistência é semelhante ao que ocorre em *Colletotrichum acutatum*, permanece a ser esclarecida. O fungicida triazol teve sua concentração efetiva para inibição de 50% do crescimento micelial (CE₅₀) e a concentração mínima inibitória (CMI) aumentadas para isolados de *C. gloeosporioides* em relação a isolados de *C. acutatum* utilizados como controle. Tais resultados são preocupantes uma vez que há relatos de linhagens de *C. gloeosporioides* causando a doença PFC. Assim, foram encontradas linhagens de *C. gloeosporioides* altamente resistentes a fungicidas triazóis e benzimidazóis

colonizando plantas de citros e da vegetação espontânea em pomares cítricos que podem estar contribuindo para a incidência da doença no estado de São Paulo, Brasil.

Palavras chave: Resistência a fungicidas, Carbendazim, Triazol, Mutação silenciosa, Gene da *β -tubulina*.

RESISTANCE OF *Colletotrichum gloeosporioides* *stricto sensu* TO THE BENZIMIDAZOLES FUNGICIDES AND MUTATIONS IN THE β -*tubulin* GENE

Abstract

The Postbloom Fruit Drop (PFD) is caused by the fungus *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides*. It is mainly controlled by fungicide sprays during flowering. Benzimidazoles fungicide, such as carbendazim (Derosal 500[®]) is specific inhibitors that connected to tubulin molecules, preventing the formation of microtubules in cell division, stopping the mycelial growth and spore production. Thus the development of resistant strains is a major concern in the management of the disease. Mutations in the β -*tubulin* gene as occurring in the codons 6, 50, 167, 198, 200 and 240 alter the amino acid sequence of the binding site causing resistance to the benzimidazole in pathogenic fungi. The triazole fungicides, such as Nativo[®], are composed of Tebuconazole and Trifloxystrobin which inhibit the respiratory chain and biosynthesis of ergosterol, an important component of cell membrane. The aim of this study was to verify the presence of *C. gloeosporioides* endophytic of citrus plants and the natural vegetation of citrus orchards of the State of São Paulo, Brazil as resistance to carbendazim and triazole fungicide, and the association of this with mutations in the partial β -*tubulin* gene sequence. The resistance to carbendazim fungicide was observed in 37 of the 120 isolates (30,8%) of citrus plants and 43 of 69 strains (62,3%) of plants from natural vegetation. All isolates were resistant citrus plants from a citrus orchard with the application of the fungicide for more than 10 years. All resistant isolates from the citrus plants and the natural vegetation presented highly resistant, indicating that prolonged use of carbendazim generates resistant isolates diminishing their effectiveness in the field. All 189 isolates of *C. gloeosporioides* showed the same sequence for the β -*tubulin* gene, there was no change in the nucleotide region encoding codons which have been reported mutations associated with resistance to fungicides. However, all the isolates presents mutations (SNP) in codons 76, *Colletotrichum acutatum* 80, 82, 169, 203 and 236 without altering the amino acid in the protein tubulin resulting. Since both resistant and sensitive isolates exhibit such SNPs, and they do not alter the encoded amino acid, such changes should not be associated with resistance seen in these isolates. If mutations in other regions of the β -*tubulin* gene not analyzed are responsible for such resistance or if in *C. gloeosporioides* species the resistance is similar to what occurs in, remains to be clarified. The triazole fungicide had its effective concentration for 50% inhibition of mycelial growth (EC₅₀) and the minimum inhibitory concentration (MIC) increased for isolates of *C. gloeosporioides* against isolates of *C. acutatum* used as controls. These results are worrying once there are reports of strains of *C. gloeosporioides* causing PFC disease. Thus, were found strains of *C. gloeosporioides* highly resistant to benzimidazole and triazole fungicides colonizing citrus plants and natural vegetation in citrus orchards that may be contributing to the incidence of the disease in the state of São Paulo, Brazil.

Keywords: Resistance to fungicides, Carbendazim, Triazole, Silente mutation, β -*tubulin* gene.

5.1 Introdução

A doença Podridão Floral dos Citros (PFC) teve inicialmente identificado como agente causal o fungo *Colletotrichum gloeosporioides* (FAGAN, 1979). Posteriormente, estudo utilizando marcadores moleculares constatou que o agente responsável pela doença é o fungo *Colletotrichum acutatum* (BROWN *et al.*, 1996). No entanto, pesquisa com fungos isolados de flores de citros apresentando sintomas de PFC foram identificados como sendo o fungo *C. gloeosporioides*, associado com testes de patogenicidade e comparações do desenvolvimento da doença por *C. acutatum* e *C. gloeosporioides* indicaram *C. gloeosporioides* novamente como um dos agentes epidemiológicos da PFC (LIMA *et al.*, 2011).

Esta doença é amplamente distribuída nos trópicos e subtropicais úmidos das Américas, principalmente em locais que propiciam mais de uma florada dos citros (*Citrus* spp.), ou seja, variedades que florescem mais de uma vez por ano, favorecem a ocorrência da PFC (FEICHTENBERGER *et al.*, 2005). Dessa maneira, Flórida (USA) e São Paulo (Brasil), importantes produtores mundiais de citros, estão sujeitos ao aparecimento da doença em virtude da distribuição e quantidade de chuvas durante o período de florescimento (PERES *et al.*, 2002; FEICHTENBERGER *et al.*, 2005).

Os sintomas iniciais mais evidentes da doença são lesões alaranjadas nas pétalas de flores abertas (TIMMER *et al.*, 1994). Os discos basais, os cálices e os pedúnculos ficam aderidos aos ramos enquanto os frutos recém-formados apresentam uma descoloração amarelo-pálida e caem rapidamente (FEICHTENBERGER; MÜLLER; GUIRADO, 1997).

A pulverização com fungicidas durante o florescimento é essencial para o controle da doença (DENHAM; WALLER, 1981; TIMMER & BROWN, 2000). Os fungicidas captafol e benomil utilizados em mistura ou não, mantiveram a doença sob controle nos locais em que ela se tornou endêmica (FAGAN, 1984; TIMMER *et al.*, 1994). No entanto, com a proibição destes fungicidas, outros como carbendazim, triazóis, folpet e difenoconazole passaram a ser utilizados para o controle da PFC no Brasil (PERES *et al.*, 2002; GOES *et al.*, 2008).

Fungicidas benzimidazóis são inibidores específicos que se ligam às moléculas de tubulina, proteína responsável pela formação dos microtúbulos nas divisões celulares, processo essencial ao crescimento micelial e produção de

esporos, e assim impedem seu desenvolvimento (DAVIDSE, 1986). Pelo fato de apresentarem um modo específico de ação, o desenvolvimento de isolados resistentes é uma grande preocupação no manejo da doença. Fungicidas benzimidazóis tem sido utilizados por mais de 30 anos, e já foram reportados numerosos casos de resistência de *Colletotrichum* spp. em várias culturas assim como outros patógenos de citros (GRIFREE, 1973; WHITESIDE, 1980a; 1980b).

Resistência a fungicidas benzimidazóis, como o Carbendazim (Derosal 500[®]), tem sido detectada em muitas espécies de fungos. Na maioria dos casos a resistência está correlacionada com mutação no gene da β -tubulina. Resultados de diversos estudos mostram que alterações nos códons 6, 50, 167, 198, 200 e 240 alteram a sequência de aminoácidos no sítio de ligação do benzimidazol causando resistência em fungos patogênicos (MA, MICHAILIDES, 2005; LIU 2010). Pela utilização de PCR-RFLP os autores realizaram análise de pontos de mutação no códon 198 e 200, permitindo o desenho de *primers* específicos para essas mutações (CHUNG *et al*, 2010).

Quando a resistência aos benzimidazóis já está estabelecida, ela se torna persistente e a aplicação sobre populações resistentes, em geral, agrava o problema (BRENT, 2007).

Os fungicidas triazóis, como é o caso do Nativo[®], são constituídos por Trifloxistrobina e Tebuconazol e tem sua atividade por meio das estrobilurinas que provocam inibição da cadeia respiratória inibindo o complexo III, interrompendo a fosforilação oxidativa e interferindo na ação a ATP-sintase; e os triazóis que atuam inibindo a biossíntese do ergosterol, substância importante para a manutenção da integridade da membrana celular das células fúngicas (WONG & MIDLAND, 2007). Estes fungicidas, como o Nativo[®] vem sendo utilizado no controle da PFC e antracnoses, mas no entanto a avaliação de resistência tem sido pouco explorada para este grupo. No Brasil não há trabalhos realizados para verificar o surgimento de populações de espécies de *Colletotrichum* resistentes ao fungicida Nativo[®].

Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi verificar a presença de isolados de *C. gloeosporioides* provenientes de plantas cítricas e plantas da vegetação espontânea de pomares cítricos do Estado de São Paulo-Brasil quanto a resistência a fungicidas dos grupos triazol e benzimidazol, e a associação da resistência ao carbendazim com mutações no gene da β -tubulina.

5.2 Materiais e Métodos

5.2.1 Coleção de Isolados

Foram analisados 189 isolados fúngicos previamente identificados por sequenciamento multigênico como pertencentes à espécie *C. gloeosporioides stricto sensu* (WACULICZ-ANDRADE *et al.*, 2013). Os isolados foram obtidos pela metodologia de isolamento de fungos endofíticos e são provenientes de pomares do estado de São Paulo – Brasil. 120 isolados são provenientes de folhas aparentemente saudáveis de plantas cítricas com sintomas de PFC e 69 de plantas da vegetação espontânea presentes nestes pomares.

5.2.2 Teste de Resistência aos Fungicidas

Para determinar a resistência dos isolados ao fungicida Carbendazim (Derosal 500®) foram realizados ensaios *in vitro*, em meio de cultura com o fungicida, tanto em isolados de folhas de citros quanto de folhas da vegetação espontânea.

Discos de micélios de 10 mm de diâmetro foram obtidos das bordas de colônia cultivada por 3 dias em meio BDA pH 6,8 e transferidos para o centro de novas placas de Petri contendo o fungicida nas concentrações de 0,1; 1,0; 10; 100; 500 e 1000 mg/L e placa sem a presença do fungicida como controle. O fungicida carbendazim foi adicionado ao meio BDA pH 6,8 após autoclavagem. Cada isolado analisado teve 5 repetições, incubados a temperatura de 28°C na ausência de luz por um período de 7 dias. O diâmetro de cada colônia foi medido, a porcentagem de crescimento foi calculada e os dados foram expressos como porcentagem de controle. Os valores obtidos foram categorizados como fenótipo de resistência ao carbendazim e avaliados em 4 níveis de acordo com as descrição de Nalumpang *et al.*, 2010; como mostra a tabela 1.

TABELA 1 – NÍVEIS DE RESISTÊNCIA DE *Colletotrichum gloeosporioides* AO FUNGICIDA CARBENDAZIM NAS CONCENTRAÇÕES: 0,1, 1, 10, 100, 500 E 1,000 mg/L EM BDA pH6,8

Níveis de resistência	Concentração de Carbendazim (mg/L)					
	0,1	1,0	10	100	500*	1000
Sensível	✓	X	X	X	X	X
	✓	✓	X	X	X	X
Fracamente resistente	✓	✓	✓	X	X	X
Moderadamente resistente	✓	✓	✓	✓	X	X
Altamente resistente	✓	✓	✓	✓	✓	X
	✓	✓	✓	✓	✓	✓

* - concentração recomendada no campo

✓ - porcentagem de crescimento $\geq 10\%$ comparado com o controle

X - porcentagem de crescimento $< 10\%$ comparado com o controle

Para determinar a resistência dos isolados ao fungicida triazol (Nativo[®]) as concentrações utilizadas foram: 0,05; 0,5; 5; 25 e 50 mg/L. Tendo como parâmetro as concentrações aplicadas para o fungo *C. acutatum*. Sendo a concentração efetiva para inibição de 50% do crescimento micelial (CE_{50}) de 0,5 mg/L e a concentração mínima inibitória, a qual inibe 100% do crescimento, de 25mg/L.

5.2.3 Extração de DNA

Os 189 isolados foram cultivados por 3 dias em placa de Petri contendo meio BDA sob temperatura de 28°C, no claro. O micélio foi coletado e o DNA genômico foi obtido utilizando o Microbial DNA Isolation Kit (12224-5 - Mo Bio Laboratories) de acordo com as instruções do fabricante.

5.2.4 Análise por Sequenciamento Parcial do Gene β - tubulina

Para a amplificação parcial do gene da β -tubulina foram utilizados dois pares de primers: TB2L/TB2R e TubA/TubCollR, tabela2.

TABELA 2 – PRIMERS UTILIZADOS NESTE TRABALHO, NOMES, SEQUÊNCIAS E REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

Primer	Sequência (5'-3')	Referência
TB2L	GTT TCC AGA TCA CCC ACT CC	PERES <i>et al.</i> , 2004
TB2R	TGA GCT CAG GAA CAC TGA CG	PERES <i>et al.</i> , 2004
TubA	AAA TGC GTG AGA TTG TA	McKAY <i>et al.</i> , 1998
TubCollR	GGA GTG GGT GAT CTG GAA AC	Presente trabalho

O *primer* tubCollR foi desenhado no presente trabalho com base na sequência do gene da β -tubulina de *Colletotrichum gloeosporioides* (Genbank U14138).

Ambas as reações de PCR foram realizadas com um volume total de 12,5 μ L solução, em água ultrapura contendo 1,25 μ L de tampão 10X para PCR, 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de uma mistura de dNTP, 0,2 μ M de cada primer, 20ng/ μ L de DNA extraído e 0,5 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen®), sendo as amplificações realizadas em termociclador Eppendorf® (Modelo: Mastercycler Gradient).

Para a reação TB2L/TB2R a amplificação teve início com a desnaturação inicial a 95° C por 5 minutos; 30 ciclos de 60 segundos a 95° C, 60 segundos a 35° C, 60 segundos a 72° C; seguida de extensão final de 5 minutos a 72° C; e para a reação TubA/TubCollR a amplificação seguiu desnaturação inicial de 95° C por 5 minutos; 30 ciclos de 60 segundos a 95° C, 60 segundos a 55,7° C, 60 segundos a 72° C; seguida de extensão final de 5 minutos a 72° C.

Aos produtos das reações de PCR foram adicionados 7 μ L de acetato de amônio (AcNH₄) 7,5 M, e 60,0 μ L de etanol absoluto. Após suave homogenização, as amostras foram colocadas em gelo por 1 hora e centrifugadas por 10 minutos a 13000 rpm a 25°C, descartando o sobrenadante. O *pellet* foi então lavado com 100 μ L de etanol 70% recém preparado, centrifugado a 13000 rpm por 10 minutos seguido de secagem *overnight*. O produto purificado foi então ressuspendido em 13

μL de água ultrapura. O produto da PCR purificada foi então visualizado e quantificado em gel de agarose 1,5% (p/v).

Para a reação de sequenciamento foram utilizadas de 50 a 100 ng do produto de PCR purificado, 0,25 μM do *primer*, 2 μl da mistura para sequenciamento ET (kit: DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit for MegaBACE da Amersham Biosciences®) e água ultrapura quando necessária para completar um volume final de 10 μl.

A amplificação foi realizada seguindo desnaturação inicial a 94° C por 2 minutos; 35 ciclos de 20 segundos a 94° C, 15 segundos a 50° C e 1 minutos a 60°C. As reações de sequenciamento foram purificadas com Sephadex™ G-50 *Fine DNA Grade*, e submetidas à eletroforese em Sequenciador Automático de DNA modelo MegaBACE (Amersham Biosciences®). A edição e o alinhamento das sequências obtidas foi realizado com auxílio dos programas BioEdit 7.0.5.3 (HALL, 2001) e MEGA 5.1 (KUMAR *et al.*, 2008).

5.3 Resultados

5.3.1 Teste de Resistência aos Fungicidas

A resistência ao fungicida carbendazim foi observada em 37 dos 120 isolados provenientes de plantas de citros, todos pertencentes a um mesmo pomar analisado, e em 43 dos 69 isolados provenientes de plantas da vegetação espontânea. Todos os isolados resistentes, tanto de citros como da vegetação espontânea foram categorizados como altamente resistentes. Desta forma, as categorias fraca e moderadamente resistentes não foram observadas.

Nas plantas de citros a porcentagem de isolados resistentes foi de 30,8% e nas plantas da vegetação espontânea 62,3%. Assim, dos 189 isolados de *C. gloeosporioides* analisados 42% se mostraram altamente resistentes (Figura 1).

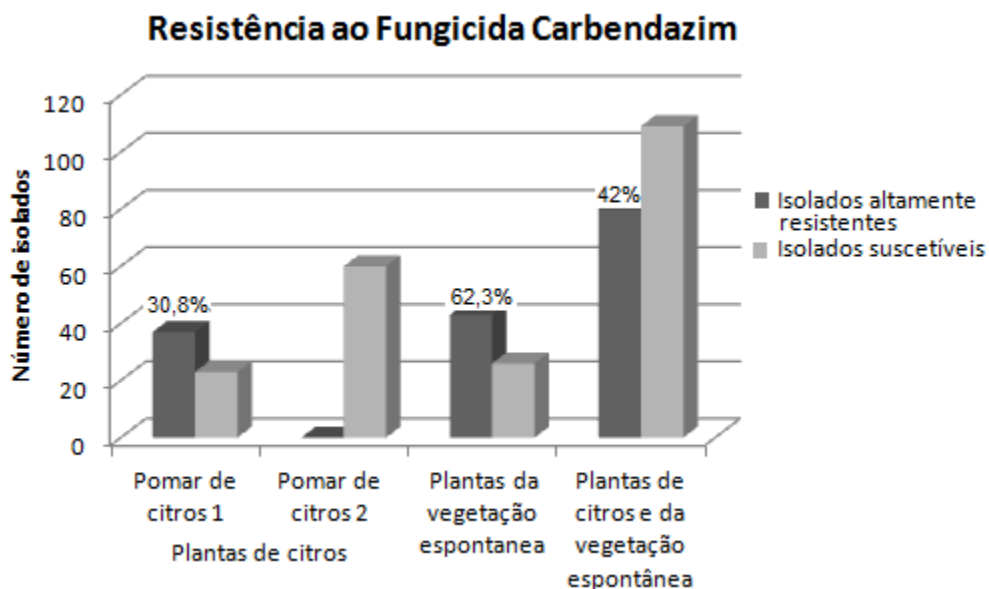


Figura 1 - Número de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* altamente resistentes e suscetíveis ao fungicida carbendazim provenientes de plantas de citros e da vegetação espontânea.

O fungicida triazol apresentou uma taxa de inibição de crescimento de 77% na concentração de 25mg/L e de 100% em 50mg/L. Dessa forma, CE_{50} e CMI para o fungo *C. gloeosporioides* analisados, correspondem a 5,0 e 50 mg/L respectivamente como mostra a figura 2.

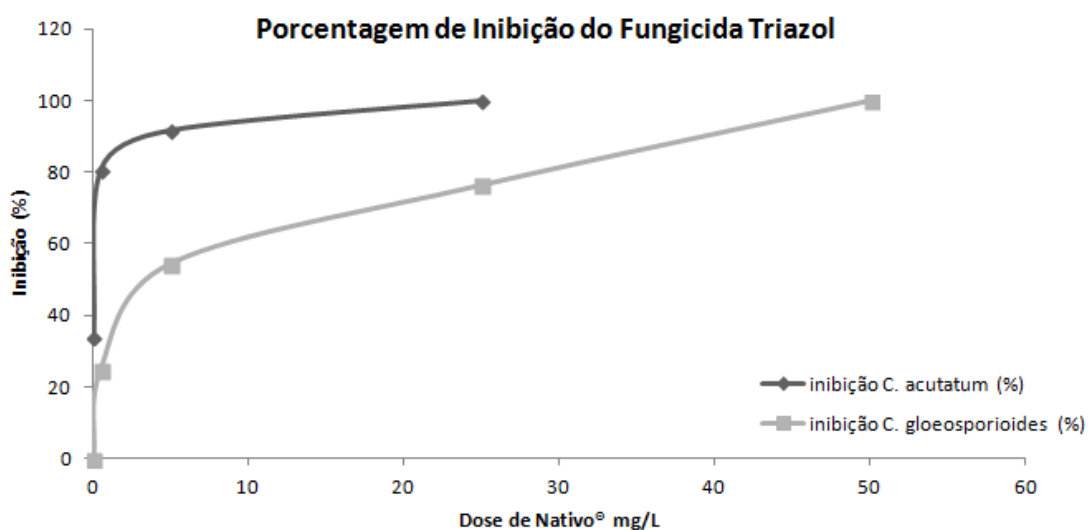


Figura 2 - Porcentagem de inibição do crescimento micelial de isolados de *C. acutatum* e *C. gloeosporioides* pelo fungicida triazol

5.3.2 Análise por Sequenciamento Parcial do Gene β -tubulina

Todos os 189 isolados de *C. gloeosporioides* avaliados apresentaram a mesma sequência para o gene da β -tubulina, não apresentando mutações nos códons 6, 50, 167, 198, 200 e 240 nos quais há relatos na literatura de mutação e associação com resistência a fungicidas benzimidazóis. Por outro lado, todos os isolados apresentaram mutações (SNP) nos códons 76, 80, 82, 169, 203 e 236, sem, entretanto alterar o aminoácido na proteína tubulina resultante.

TABELA 3- CÓDONS CONTENDO SNPs EM ISOLADOS DE *Colletotrichum gloeosporioides* EM RELAÇÃO A SEQUÊNCIA *Colletotrichum gloeosporioides* (Genbank U14138).

Códon	Selvagem	Mutante	Aminoácido
76	GCT	GCC	Alanina
80	GGC	GGT	Glicina
82	CTG	CTC	Leucina
169	GTC	GTG	Valina
203	GAC	GAT	Ácido aspártico
236	GTC	GTT	Valina

Para explicar o fato de não ter sido encontrada mutação associada a resistência a fungicidas nos isolados do presente trabalho, foi realizada comparação das sequências ITS1-5,8S-ITS2 do rDNA dos isolados de Nalumpang e colaboradores (2010) juntamente com os isolados de Weir e colaboradores (2012), trabalho que reclassificou o complexo de espécies *C. gloeosporioides*; a fim de se verificar a real identificação dos isolados de Nalumpang e colaboradores (2012), por análise de Máxima Verossimilhança como apresentado na árvore da figura 3.



Figura 3 – Árvore filogenética de Máxima Verossimilhança utilizando as sequências da região ITS1-5,8S-ITS2 do rDNA dos isolados de Nalupang e colaboradores (2010) e Weir e colaboradores (2012).

5.4 Discussão

A resistência a fungicidas benzimidazóis tem sido detectada em muitas espécies de fungos. Na maioria dos casos, a resistência está relacionada com mutações de ponto no gene da β -tubulina, as quais resultam em alterações na sequência de aminoácido no sítio de ligação ao benzimidazol. Resultados de numerosos estudos têm mostrado que alterações no códon 6, 50, 167, 198, 200 e 240 no gene da β -tubulina podem causar resistência a fungicidas benzimidazóis em vários fungos patogênicos no campo (MA & MICHAILIDES, 2005; NALUPANG *et al.*, 2010; KONGTRAGOUL, *et al.*, 2011).

Mutações em diferentes códons do gene da β -tubulina resultam em diferentes níveis de resistência aos benzimidazóis. No fungo *Monilinia fructicola*, por exemplo, mutações no códon 6 e 198 levam a baixo e alto nível de resistência, respectivamente (MA, YOSHIMURA & MICHAILIDES, 2003). Em *Venturia inaequalis*, a mutação no códon 198 e 200 causam médio e alto nível de resistência, respectivamente (KOENRAADT *et al.*, 1992). Da mesma forma, diferentes substituições no mesmo códon, podem causar variados níveis de resistência. Mutantes de *Tapesia yallundae* com alteração no códon 198 correspondente ao aminoácido ácido glutâmico, quando alterado para alanina, glicina, lisina e glutamina tem a concentração efetiva para inibição de 50% do crescimento micelial (CE₅₀) variando de concentrações de 0,5 para mais de 25mg/L (ALBERTINI *et al.*, 1999).

Os isolados analisados neste estudo mostraram dois níveis de resistência, classificados em suscetíveis e altamente resistentes. A porcentagem dos isolados altamente resistentes se mostrou elevada, 42%, significando que o fungicida carbendazim em virtude de sua prolongada utilização tem gerado isolados resistentes. O que reflete no campo uma baixa efetividade de sua utilização, com a possível persistência da doença, levando a perdas de produção pelos produtores de citros no Brasil. Importante ressaltar que os isolados altamente resistentes de plantas de citros foram encontrados apenas em um dos pomares analisados, onde a aplicação do fungicida carbendazim se faz por mais de 10 anos para o controle da doença PFC.

Uma vez que foram identificados isolados resistentes por meio do sequenciamento do gene da β -tubulina, seria esperado encontrar relação entre mutação e resistência ao fungicida benzimidazol analisado, o carbendazim. No entanto, essa correlação não foi encontrada, uma vez que todos os isolados apresentaram a mesma sequência do gene da β -tubulina sem apresentar mutações já relacionadas com resistência.

Analisando outras regiões do gene, além das já relatadas com presença de mutação e alteração na resposta a benzimidazóis, foi possível perceber seis diferentes mudanças na sequência de nucleotídeos, sem, contudo alterar os aminoácidos na cadeia polipeptídica formada. Aparentemente uma mutação silenciosa ou sinônima.

Polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) são pequenas alterações genéticas em regiões codificantes ou não codificantes do genoma. E sendo o código genético degenerado, significa que muitos aminoácidos são representados por mais de um códon. Assim, muitos SNPs são considerados silenciosos quando resultam em substituição de códons sinônimos. Mas essas alterações nem sempre são de fato silenciosas, podendo causar efeitos como alteração na conformação e função da proteína, mesmo o códon codificando para o mesmo aminoácido (SAUNA *et al.*, 2007). Ou ainda, provocar alterações de processamento interferindo em ligações com miRNA (PARMLEY & HURST, 2007).

Uma vez que o código genético é degenerado e os aminoácidos em geral, apresentam mais de um códon, há no interior celular uma dinâmica de produção de tRNA com os códons mais frequentes, chamados de códons ótimos, específicos para cada aminoácido. Dessa maneira, é vantajoso que na sequência de nucleotídeos o códon para determinado aminoácido seja o mais frequente, o códon ótimo, assim o produto gênico será mais rapidamente expressso. Quando esse processo não ocorre e os códons não ótimos passam a ser utilizados, influenciam a expressão, estrutura e função da proteína gerada (ZHOU *et al.*, 2013).

Partindo desse princípio foi descrito o padrão de utilização do código genético para diferentes espécies, como *Escherichia coli*, por exemplo, (SHARP, 1988). E dessa forma, pode ser analisada a variação de resposta de *E. coli* em relação à tolerância a colicina em presença de mutação silenciosa para o aminoácido leucina codificado pelo códon CUA e alterado para CUG, CUC ou CUU, códons ótimo e subótimos respectivamente. E assim, a alteração para os

códons subóticos apresentou diminuição de tolerância a colicina em relação ao códon ótimo (MAKINO *et al.*, 1997).

Vários estudos têm mostrado que mutações sinônimas também estão sob pressão da evolução e podem estar envolvidas em mecanismos de doenças. Alguns mecanismos nos quais as mutações sinônimas alteram a estrutura, função e níveis de expressão de proteína estão sendo elucidados (CHAMARY, PARMLEY & HURST, 2006; SAUNA *et al.*, 2007; PARMLEY & HURST, 2007; ALONSO *et al.*, 2011)

Estudos têm demonstrado que polimorfismos sinônimos podem afetar *splicing* de RNA, estabilidade e estrutura da proteína, assim como sua interação com o DNA, causando efeitos significativos na função da proteína (KIMCHI-SARFATY *et al.*, 2007; HUNT *et al.*, 2010; MEI, 2012).

Entretanto, uma vez que tanto isolados de *C. gloeosporioides* resistentes quanto sensíveis analisados neste trabalho apresentam tais SNPs, e por tais mutações não alterarem o aminoácido codificado, elas não devem estar associadas à resistência observada nestes isolados. Então como explicar tal resistência encontrada nos isolados no presente trabalho e os relatos de Nalumpang *et al.* (2010) quanto a presença de mutações clássicas nos códons 198 e 200 no gene da β -tubulina de *C. gloeosporioides*? Uma explicação plausível é que os isolados analisados e identificados por estes autores não correspondem a *C. gloeosporioides stricto sensu* e sim a outra espécie do complexo. Conclui-se isso analisando-se as sequências da região ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA dos isolados identificados como *C. gloeosporioides* em Nalumpang e colaboradores (2010).

Desta forma, se mutações em outras regiões do gene β -tubulina não analisadas são responsáveis por tal resistência ou se na espécie *C. gloeosporioides* a resistência é semelhante ao que ocorre em *Colletotrichum acutatum*, permanece a ser esclarecida. Fungicidas benzimidazóis são utilizados para o controle da PFC com efetividade diferenciada entre isolados de *C. acutatum* e *C. gloeosporioides*. Isolados de *C. acutatum* de citros são muito menos sensíveis aos benzimidazóis em cultura do que outros fungos patogênicos de plantas. Em contraste, isolados de *C. gloeosporioides* são completamente inibidos com 1 ug/mL do mesmo fungicida em cultura. (SONODA & PELOSI, 1988; GOES & KIMATI, 1994; PERES *et al.*, 2002b).

Dessa forma, ao se testar o fungicida triazol em relação aos isolados de *C. gloeosporioides* foram utilizadas como parâmetro as concentrações aplicadas para o fungo *C. acutatum*. Na expectativa de que o padrão de resposta ao fungicida triazol fosse semelhante ao apresentado para o fungicida carbendazim. No entanto, os isolados de *C. gloeosporioides*, se mostraram com maior tolerância ao fungicida triazol. Sendo necessária uma concentração dez vezes maior para CE₅₀ e duas vezes maior para CMI para se alcançar o mesmo resultado, quando se comparam as duas espécies de *Colletotrichum*.

Tais resultados são preocupantes uma vez que há relatos de linhagens de *C. gloeosporioides* causando a doença PFC. Assim, foram encontradas linhagens de *C. gloeosporioides* altamente resistentes a fungicidas triazóis e benzimidazóis colonizando plantas de citros e da vegetação espontânea em pomares cítricos que podem estar contribuindo para a incidência da doença no estado de São Paulo.

5.5 Conclusão

Plantas cítricas e da vegetação espontânea de pomares cítricos abrigam isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* altamente resistentes ao fungicida carbendazim, indicando que sua utilização prolongada gera isolados resistentes diminuindo sua efetividade no campo.

O fungicida triazol analisado teve sua efetividade de controle diminuída em isolados de *C. gloeosporioides*, quando comparado com isolados de *C. acutatum*.

Não há relação entre a resistência dos isolados de *C. gloeosporioides* ao fungicida carbendazim e mutações clássicas nos codons do gene da β -tubulina, sugerindo que talvez a resistência nesta espécie seja semelhante ao que ocorre em *C. acutatum*.

Regiões de mutação silenciosa foram identificados no gene da β -tubulina sem relação com resistência a fungicidas e ainda sem esclarecimento de sua funcionalidade.

Isolados relatados na literatura apresentando mutações no gene da β -tubulina devem ser analisados quando a sua real identificação como pertencentes à espécie *C. gloeosporioides*.

5.6 Referências

ALBERTINI, C., GREDT, M., AND LEROUX, P. Mutations on the b-tubulin gene associated with benzimidazole resistance in the cereal eyespot fungi *Tapesia yallundae* and *Tapesia acuformis*. Pesticide Biochem. and Physiol. 64:17-31.1999.

ALONSO, M., PALACIOS, J.J.; HERRANZ, M.; PENEDO, A.; MENÉNDEZ, A.; BOUZA, E.; VIEDMA, D.G. Isolation of *Mycobacterium tuberculosis* strains with a silent mutation in *rpoB* leading to potential misassignment of resistance category. J. Clin. Microbiol. 49:2688–2690.2011.

BRENT, K. J. Fungicide resistance in crop pathogens: How can it be managed? Fungicide Resistance Action Committee, Monograph No. 1. 2007. Available at <http://www.frac.info>

BROWN, A. E.; SREENIVASAPRASAD, S.; TIMMER, L.W. Molecular characterization of slow-growing orange and key lime anthracnose strains of *Colletotrichum* from citrus as *C. acutatum*. Phytopathology 86(5): 523-527.1996.

CHAMARY, J. V.; PARMLEY, J. L.; HURST, L.D. Hearing silense non neutral evolution at synonymous sites in mammals. Nat Rev Genet. Feb;7(2):98-108. (2006).

CHUNG, W. H.; CHUNG, W. C.; PENG, M. T.;YANG, H. R. Specific detection of benzimidazole resistance in *Colletotrichum gloeosporioides* from fruit crops by PCR-RFLP. New Biotechnology 27(1):17-24. 2010.

DENHAM, T.G.; WALLER, J.M. Some epidemiological aspects of postbloom fruit drop disease (*Colletotrichum gloeosporioides*) in citrus. Annals of Applied Biology, Warwickshire, v. 98, n. 1, p. 65- 77, 1981.

DAVIDSE, L. C. Benzimidazole fungicides: Mechanism of action and biological impact. Ann. Rev. Phytopathol. 24: 43-65. 1986.

FAGAN, H.J. Postbloom fruit drop of citrus, a new disease of citrus associated with a form of *Colletotrichum gloeosporioides*. Annual Applied Biology, London, v.91, n.1, p.13-20, 1979.

FAGAN, H.J. Postbloom fruit drop of citrus in Belize: II. Disease control by aerial ground spraying. Turrialba 34(2): 179-186. 1984.

FEICHTENBERGER, E.; BASSANEZI, R.B.; SPÓSITO, M.B.; BELASQUE Jr., J. Doenças dos citros. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. Manual de Fitopatologia. v.2. Editora Ceres, São Paulo. p. 239-269. 2005

FEICHTENBERGER, E., MÜLLER, G.W., GUIRADO, N. Doenças dos citros (*Citrus* spp). In: KIMATI, H., AMORIM, L., BERGAMIN, A.F., CAMARGO, L.E.A., REZENDE, J.A.M. Manual de Fitopatologia. 3.ed. São Paulo: Agronômica Ceres, v.2, p.280-284, 1997.

GOES, A.; KIMATI, H. 1994. Efeito de benomyl no crescimento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides*, agente causal da queda prematura de frutos jovens de citros. Summa Phytopathol. 20: 46, 1994.

GOES, A.; GARRIDO, R.B.O.; REIS, R.F.; BALDASSARI, R.B.; SOARES, M.A. Evaluation of fungicide applications to sweet orange at different flowering stages for control of postbloom fruit drop caused by *Colletotrichum acutatum*. Crop Protection, Oxford, v. 27, n. 1, p. 71–76. 2008.

GRIFFEE, P. J. Resistance to benomyl and related fungicides in *Colletotrichum musae*. Trans. Brit. Mycol. Soc. 60: 887. 1973

HALL, B. G. Phlogenetic Trees Made Easy: A How-to Manual for Molecular Biologists. Massachusetts U.S.A.: Sinauer Associates, Inc., 2001.

HUNT, R.; SAUNA, Z. E.; AMBUDKAR, S. V.; GOTTESMAN, M. M.; KIMCHI-SARFATY, C. Silent (synonymous) SNPs: should we care about them? Methods Mol Biol 578: 23–39. 2009.

KONGTRAGOUL, P.; NALUPAN, S.; MIYAMOTO, Y.; IZUMI, Y.; AKIMITSU, K. Mutation at codon 198 of *tub2* gene for carbendazim resistance in *Colletotrichum gloeosporioides* causing mango antracnose in Thailand. Journal of Plant Protection Research, vol 51, n.4, 2011.

KIMCHI-SARFATY, C.; OH, J.M.; KIM, I. W.; SAUNA, Z. E.; CALCAGNO, A. M.; AMBUDKAR, S. V.; GOTTESMAN, M. M. A “silent” polymorphism in the MDR1 gene changes substrate specificity. Science 315: 525–528. 2007.

KOENRAADT, H.; A. L. JONES. The use of allele-specific oligonucleotide probes to characterize resistance to benomyl in field strains of *Venturia inaequalis*. *Phytopathology* 82:1354–1358. 1992.

KUMAR S, DUDLEY J, NEI M & TAMURA K MEGA: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Brief Bioinform.* 9: 299-306. 2008.

LIMA, W. G.; SPÓSITO, M. B.; AMORIM, L.; GONÇALVES, F.P.; FILHO, P. A. M. *Colletotrichum gloeosporioides*, a new causal agent of citrus post-bloom fruit drop. *European Journal of Plant Pathology*, v. 131, p. 157-165, 2011.

LIU,X.;YIN,Y.;WU,J.; JIANG,J. AND MA,Z. Identification and Characterization of Carbendazim-Resistant Isolates of *Gibberella zeae*. *Plant Disease*, Vol. 94, N. 9, Pages 1137-1142. 2010.

MA, Z., YOSHIMURA, M.A., MICHAILIDES, T.J. Identification and characterization of benzimidazole resistance in *Monilinia fructicola* from stone fruit orchards in California. *Applied and Environmental Microbiology* 69:7145-52. 2003.

MA, Z., AND T. J. MICHAILIDES. Advances in understanding molecular mechanisms of fungicide resistance and molecular detection of resistant genotypes in phytopathogenic fungi. *Crop Protection* 24:853-863. 2005.

MAKINO, S.; QU, J. N.; UEMORI, K.; ICHIKAWA, H.; OGURA, T.;MATSUZAWA, H. A silent mutation in the *ftsH* gene of *Escherichia coli* that affects FtsH protein production and colicin tolerance. *Molecular General Genetics*.20;254(5):578-83.1997.

MCKAY, G. J.;EGAN, D.; MORRIS,E.; BROWN, A.E. Identification of benzimidazole resistance in *Cladobotryum dendroides* using a PCR-based method. *Mycol. Res.* 102:671–676. 1998.

MEI, X. "How a silent mutation supresses the activity and iron incorporation in superoxide dismutase". Theses and Dissertations--Chemistry.Paper <http://uknowledge.uky.edu/>. 2012.

NALUMPANG, S.; MIYAMOTO, Y; MIYAKE, C.; IZUMI, Y.; AKITMITSU, K.; KONGTRAGOUL, P. Point mutations in the beta-tubulin gene conferred carbendazim-resistant phenotypes of *Colletotrichum gloeosporioides* causing 'Nam

Dok Mai' mango anthracnose. Journal of Agricultural Technology Vol.6(2): 365-378. 2010.

PARMLEY, J. L.; HURST, L. D. How do synonymous mutations affect fitness? BioEssays 515–519, 2007.

PERES, N. A. R.; KURAMAE, E. E.; DIAS, M. S. C.; de SOUZA, N. L. Identification of *Colletotrichum* spp. affecting fruit after harvest in Brazil. Journal Phytopathology. 150; 128-134. 2002a.

PERES, N. A. R.; SOUZA, N. L.; ZITKO, S. E.; TIMMER, L. W. Activity of benomyl for control of postbloom fruit drop of citrus caused by *Colletotrichum acutatum*. Plant Dis. 86: 620-624. 2002b.

PERES N. A. R.; SOUZA, N. L.; PEEVER, T. L.; TIMMER, L. W. Benomyl sensitivity of isolates of *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* from citrus. Plant Disease 88:125-130. 2004.

SAUNA, Z. E.; KIMCHI-SARFATY, C.; AMBUDKAR, S. V.; GOTTESMAN, M. M. Silent polymorphisms speak: how they affect pharmacogenomics and the treatment of cancer. Cancer Research Oct 15-67. 2007.

SHARP, P. M.; COWE, E.; HIGGINS, D. G.; SHIELDS, D. C.; WOLFE, K. H.; WRIGHT, F. Codon usage patterns in *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Drosophila melanogaster* and *Homo sapiens*; a review of the considerable within-species diversity. Nucleic Acids Research Sep 12- 16 .1988

SONODA, R. M.; PELOSI, R. R. Outbreak of citrus postbloom fruit drop caused by *Colletotrichum gloeosporioides* from lesions on citrus blossoms in the Indian River of Florida. Proc. Fla. State Hortic. Soc. 101:36-38. 1988.

TIMMER, L.W., AGOSTINI, J.P., ZITKO, S.E., ZULFIQAR, M. Postbloom fruit drop, a increasingly prevalent disease of citrus in the Americas. Plant Disease, 78, n.4, p.329- 334, 1994.

TIMMER, L. W., & BROWN, G. E. Biology and control of anthracnose diseases of citrus. In D. Prusky, S. Freeman, & M. B. Dickman (Eds.), *Colletotrichum*. Host Specificity, Pathology, and Host-Pathogen Interaction (pp. 300–316). Saint Paul: APS. 2000.

WACULICZ-ANDRADE, C. E.; BINI, A. P.; ADAMOSKI, D.; GOULIN, E. H.; GALLITERASAWA, L.V.; KAVA-CORDEIRO, V.; SPÓSITO, M. B.; GLINEKE, C. *Colletotrichum gloeosporioides stricto sensu* coloniza endofiticamente plantas de citros e da vegetação espontânea e participa da epidemiologia da doença PFC em pomares cítricos do Estado de São Paulo, em preparação. 2013.

WEIR, B. S.; JOHNSTON, P. R.; DAMM, U. The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. – Stud Mycol. 73: 115–180. 2012.

WHITESIDE, J.O. Tolerance of *Mycosphaerella citri* to benomyl in Florida citrus groves. Plant Dis. 64: 300-302. 1980a.

WHITESIDE, J.O. Detection of benomyl tolerant strains of *Elsinoe fawcettii* in Florida citrus groves and nurseries. Plant Dis. 64: 871-872. 1980b.

WONG, F.P.; MIDLAND, S.L. Sensitivity distributions of California populations of *Colletotrichum cereale* to the DMI fungicides propiconazole, myclobutanil, tebuconazole, and triadimefon. Plant Disease, Saint Paul, v. 91, p. 1547-1555, 2007.

ZHOU, M.; GUO, J.; CHA, J.; CHAE, M.; CHEN, S.; BARRAL, J.M.; SACHS, M.S.; LIU, Y. Non-optimal codon usage affects expression, structure and function of clock protein FRQ. Nature. 495(7439):111-5. 2013.

6 CAPÍTULO III: PADRÃO DE INFECÇÃO E COLONIZAÇÃO DE *Colletotrichum gloeosporioides* ENDOFÍTICO DE CITROS CAUSADOR DE SINTOMAS DA PFC EXPRESSANDO O GENE REPÓRTER DsRed.

Resumo

A doença Podridão Floral do Citros (PFC) é causada pela espécie *Colletotrichum acutatum* e por alguns isolados de *C. gloeosporioides*. A PFC causa sintomas em pétalas de flores onde se formam lesões marrons ou alaranjadas acarretando a abscisão de frutos jovens com formação de cálices persistentes após a queda das pétalas nas flores infectadas. Relatos da literatura demonstram que o fungo *C. acutatum* não coloniza ativamente plantas de citros, porém permanece nas folhas como um patógeno latente, até a presença de flores, quando então se desenvolve nas pétalas. Com os recentes relatos de que linhagens de *C. gloeosporioides* podem contribuir para o desenvolvimento da PFC, objetivou-se no presente trabalho, esclarecer se tais linhagens colonizam plantas cítricas e da vegetação espontânea como endofíticos ou patógenos latentes, como é o caso de *C. acutatum*. Para tanto, linhagens de *C. gloeosporioides* foram agrotransformadas com o vetor contendo gene DsRed que codifica para uma proteína fluorescente vermelha, e posterior inoculação em plantas cítricas. A capacidade de colonização destas linhagens foi avaliada por subsequente isolamento, PCR e microscopia de epifluorescência. Desta forma, foi possível identificar penetração e colonização ativa do isolado LGMF540-DsRed1 após 28 dias de inoculação em folhas de citros. Tais resultados sugerem que ao contrário do patógeno *C. acutatum*, esta linhagem de *C. gloeosporioides* coloniza plantas de citros como o esperado para fungos endofíticos. A importância deste processo para a epidemiologia da doença PFC necessita ser esclarecida.

Palavras-chave: *Colletotrichum gloeosporioides*, Podridão Floral dos Citros, Agrotransformação, Penetração e Colonização

PATTERN OF INFECTION AND COLONIZATION OF *Colletotrichum gloeosporioides* ENDOPHYTIC OF CITRUS CAUSING THE PFD EXPRESSING REPORTER GENE DsRed

Abstract

The disease Postbloom Fruit Drop (PFD) is caused by *Colletotrichum acutatum* and some isolates of *C. gloeosporioides*. The PFD cause symptoms in flower petals which form orange or brown lesions causing abscission of young fruits forming persistent calyces after the fall of the petals on the flowers infected. Some reports show that the fungus *C. acutatum* not actively colonize citrus plants, but remains in the leaves as a latent pathogen, until the presence of flowers, then develops on the petals. With recent reports that strains of *C. gloeosporioides* may contribute to the development of the PFD, the aim of the present work was to clarify whether these strains colonize citrus plants and natural vegetation as endophytes or latent pathogens, such as *C. acutatum*. Therefore, strains of *C. gloeosporioides* were agrotransformadas with the vector containing DsRed gene encoding a red fluorescent protein and subsequent inoculation in citrus plants. The colonizing ability of these strains was assessed by subsequent isolation, PCR and epifluorescence microscopy. Thus, it was possible to identify active penetration and colonization of isolated LGMF540 - DsRed1 after 28 days of inoculation in citrus leaves. These results suggest that unlike the pathogen *C. acutatum*, this strain of *C. gloeosporioides* colonize citrus plants as expected for endophytic fungi. The importance of this process for the epidemiology of the disease PFC needs to be clarified.

Keywords: *Colletotrichum gloeosporioides*, Postbloom Fruit Drop, Agrotransformation, Penetration and Colonization.

6.1 Introdução

A doença Podridão Floral do Citros (PFC) é causada por fungos de duas espécies diferentes do gênero *Colletotrichum*: *C. acutatum* e *C. gloeosporioides*. A PFC teve inicialmente identificado como agente causal desta doença o fungo *Colletotrichum gloeosporioides* (FAGAN, 1979). Posteriormente, estudos utilizando marcadores moleculares foi constatado que o agente responsável pela doença é o fungo *C. acutatum* (BROWN *et al.*, 1996). No entanto, pesquisa com fungos isolados de flores de citros apresentando sintomas de PFC foram identificados por PCR como sendo o fungo *C. gloeosporioides*; testes de patogenicidade e comparações do desenvolvimento da doença por *C. acutatum* e *C. gloeosporioides* indicaram *C. gloeosporioides* novamente como um dos agentes epidemiológicos da PFC (LIMA *et al.*, 2011).

A PFC causa sintomas em pétalas onde se formam lesões marrons ou alaranjadas com presença de acérvulos contendo conídios envolvidos por muscilagem (FAGAN, 1984a; TIMMER *et al.*, 1994). Ainda ocorre abscisão de frutos jovens levando a formação de cálices persistentes após a queda das pétalas nas flores infectadas.

Agrobacterium tumefaciens é uma bactéria de solo, aeróbica, gram-negativa, não formadora de esporos, capaz de induzir a formação de tumores em plantas (BRASILEIRO, 1998; BRASILEIRO; LACORTE, 1998; STAFFORD, 2000). Nessas bactérias, a presença de um plasmídeo denominado de Ti (“tumor inducing”), está associada à sua capacidade de infecção. Os responsáveis por essa transferência são genes localizados em uma região do plasmídeo Ti que é denominada “região *vir*”, cujos produtos são vitais para o processamento e transferência do T-DNA (gene de interesse) à planta (WEI *et al.*, 2000). Processo fortemente induzido pelo composto denominado de acetoseringona (KADO, 1991). A transferência envolve uma série de etapas tais como quimiotaxia, adesão, indução da expressão dos genes *vir*, processamento, transferência e direcionamento do T-DNA ao núcleo e integração no genoma da célula hospedeira (TZFIRA; CITOVSKY, 2006; CITOVSKY *et al.*, 2007).

A metodologia de agrotransformação, por apresentar inúmeras vantagens, vem sendo utilizada cada vez mais para fungos filamentosos. É crescente o número de trabalhos que utilizam essa metodologia, sendo que mais de uma

centena de fungos já foi transformada por essa ferramenta biotecnológica, incluindo fungos dos filos Ascomicota, Basidiomicota, Zigomicota, Glomeromicota e Oomicetos (MICHIELSE *et al.*, 2005; LACROIX *et al.*, 2006; FÁVARO, 2009, FIGUEIREDO *et al.*, 2010).

A doença PFC quando se dá pela infecção por *C. acutatum* ocorre apenas em pétalas de flores e origina acérvulos 4 a 5 dias após a instalação do fungo. Estes passam a produzir conídios em abundância, os quais são dispersos por respingos de chuvas para outras flores durante o período de floração. A disseminação da doença é fortemente dependente do regime de chuvas, quanto mais distribuídas durante a floração maior será a incidência da doença (FEICHTENBERGER, MÜLLER; GUIRADO, 1997). Assim, locais com condições mais úmidas, com grande intensidade de chuvas e variedades de citros que propiciem mais de uma florada no ano favorecem o aparecimento da doença (FEICHTENBERGER, 1991). Segundo Agostini, Gottwald e Timmer, (1993) o orvalho e a neblina também propiciam infecções localizadas de flores, a partir de folhas ou outras flores infectadas.

Horowitz *et al.* (2002) transformaram um isolado de *C. acutatum* causador de antracnose em morango, expressando a proteína GFP, e dessa forma, verificaram que quando inoculados em morangos, os conídios formam grossas hifas e grande número de apressórios, essenciais para a penetração. Já quando tal interação é não patogênica em pimenta, beringela e tomate, os conídios germinam e produzem finos tubos germinativos com produção de apressórios os quais são incapazes de realizar penetração na planta, permanecendo epifíticos.

Nakamura *et al.* (2012) utilizando isolados transformados de *C. sansevieriae*, que tiveram perda de sua patogenicidade pela inserção do T-DNA, identificaram o local de inserção do T-DNA, identificando a região responsável pela patogenicidade no gene alfa-1,3- glucan sintetase.

Tais relatos mostram a importância do estudo da interação fungo-planta por meio da aplicação de isolados agrotransformados, auxiliando no esclarecimento dessa relação e ainda, porém permanece nas folhas como um patógeno latente, até a presença de flores, quando então se desenvolve nas pétalas. Com os recentes relatos possibilitando a identificação molecular de como esse processo acontece. Relatos da literatura demonstram que o fungo *C. acutatum* não coloniza ativamente plantas de citros de que linhagens de *C. gloeosporioides* podem

contribuir para o desenvolvimento da PFC, objetivou-se no presente trabalho, esclarecer se tais linhagens colonizam plantas cítricas e da vegetação espontânea como endofíticos ou patógenos latentes, como é o caso de *C. acutatum*.

6.2 Materiais e Métodos

6.2.1 Material Biológico

O isolado LGMF540 endofítico de folhas de citros identificado por sequenciamento multigênico como pertencente à espécie *C. gloeosporioides* (Waculicz-Andrade *et al.*, 2013), foi selecionado para ser agrotransformado a fim de se avaliar o padrão de infecção e colonização de *C. gloeosporioides* em folhas de citros.

O plasmídeo utilizado para a agrotransformação foi o pCAMDsRed, o qual contém o gene *hph* que confere resistência à higromicina, possui 12.008 pares de bases e foi construído a partir dos plasmídeos pCAMBIA1301 e pPgpd-DsRed (Eckert *et al.*, 2005).

6.2.2 Agrotransformação

Para o processo de agrotransformação foi seguida a metodologia descrita por Figueiredo *et al.* (2010), com algumas modificações. A cepa EHA105 de *Agrobacterium tumefaciens*, previamente transformada com o plasmídeo PCAMDsRed, foi recuperada do estoque em glicerol 50% a uma temperatura - 80°C, foram estriadas em placas contendo meio YEP sólido (extrato de levedura 10 g, NaCl 5 g, peptona 10 g e ágar 15 g para 1litro) suplementado com canamicina (100 ug.mL⁻¹) e rifampicina (100 ug.mL⁻¹) e acondicionadas a 28°C *overnight* para obtenção de colônias isoladas.

Para preparo do pré-inóculo uma colônia isolada da bactéria foi transferida para o frasco de vidro contendo 10 mL de meio YEP líquido (extrato de levedura 10 g, NaCl 5 g e peptona 10 g; para 1 litro) também suplementado com canamicina e

rifampicina, incubada em agitador rotacional (28°C/ 180 RPM) por 24h; a suspensão de células de agrobactéria foi diluída para uma densidade óptica a 660nm de 0,15 em meio de indução líquido (IM) (10 mM de K₂HPO₄, 10 mM KH₂PO₄, 2,5 mM de NaCl, 2,0 mM de MgSO₄, 0,7 mM de CaCl₂, 9,0 µM de FeSO₄, 4,0 mM de (NH₄)₂SO₄, 0,5% (v/v) de glicerol, 10 mM de glicose e 40 mM de ácido 2-[N-morfolino]-etanossulfônico esterilizado por filtração, pH 5,3, e adicionado ao meio de cultura após autoclavagem). Na presença ou ausência de acetoseringona (AS) na concentração de 200 µM e 400 µM em um volume final de 10 mL. As células foram incubadas a 28°C sob agitação (180rpm) até atingir OD₆₆₀ de 0,6.

O tempo para induzir a competência foi aproximadamente de 8 horas. Durante o crescimento da cultura bacteriana, foi plaqueado um disco (Ø 6mm) da cultura dos isolados a serem transformados em papel filtro, previamente autoclavados e inseridos no meio IM sólido. Em seguida ao tempo de indução, a suspensão de agrobactéria (100 µL OD₆₆₀ = 0,6) com AS (200 µM e 400 µM) ou não (controle negativo), foi inoculado junto ao disco com micélios do fungo crescido em torno de 5 mm. As placas foram incubadas a 25°C durante 48 horas e 72 horas. Após este período de cultivo os discos de micélio foram transferidos para placas contendo meio BDA suplementado com 100 µg.mL⁻¹ de higromicina B e 200 µg/mL de cefatoxima sódica e incubadas a 28°C por 10 dias. As colônias resistentes a higromicina B foram repicadas para placas de petri contendo meio de cultivo BDA suplementado com 100 µg.mL⁻¹ de higromicina B, para posterior purificação e armazenamento.

Para determinar a estabilidade mitótica dos transformantes, os supostos transformantes foram cultivados em meio seletivo por cinco gerações na ausência de higromicina e depois inoculadas em meio seletivo contendo higromicina B (100 µg/mL).

6.2.3 Caracterização e Seleção do Isolado transformado

Os transformantes gerados foram comparados com o selvagem a fim de ser escolhido o transformante com maior similaridade com o selvagem não transformado.

Para tanto os isolados transformados e o selvagem não transformado foram cultivados em placas de meio BDA pH 6,8 a 28° C, com três repetições por 7 dias a fim de se avaliar coloração da colônia, velocidade de crescimento micelial, diâmetro da colônia e esporulação.

Os isolados foram comparados por média das repetições e a esporulação por capacidade do fungo em produzir esporos na concentração 10^5 /mL por placa quando em solução salina (0,8%).

6.2.4 Inoculação em Folhas cítricas

Uma planta de laranja Pêra com 40 cm de altura e mantida no laboratório, teve a superfície de suas folhas lavadas em água corrente e os locais de inoculação foram delimitados na região central da folha, de cada um dos lados da nervura central. Foi depositada nesse local uma gota de 20µL de solução salina (0,9%) com conídios na concentração de 10^5 /mL. Cada folha foi considerada como uma repetição na mesma planta.

Foi realizado isolamento de microrganismos endofíticos das folhas 7, 14, 21 e 28 dias após inoculação. Foram utilizadas duas folhas em cada isolamento e o protocolo seguido foi o descrito por Petrini (1991) para a obtenção de isolados endofíticos.

Todas as folhas utilizadas para o isolamento de endófitos foram fragmentadas por meio de um corte longitudinal seguindo a nervura central e permanecendo esta totalmente em um dos lados, denominado de B, e o outro sem a nervura central denominado de A. Cada uma das metades da folha foi dividida em cinco fragmentos, sendo o fragmento 3 o central e onde os conídios foram inoculados, porção 1 na ponta da folha e porção 5 mais próxima ao pecíolo, como ilustra a figura 1.

Cada fragmento de folha foi cortado em fragmentos menores e colocado em placas de Petri com meio BDA pH 6,8 acrescidos de tetraciclina 100 µg/mL e higromicina 100 µg/mL, incubadas a temperatura de 28°C.

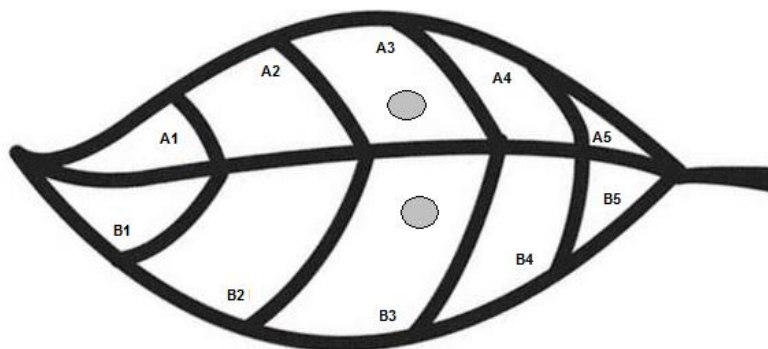


FIGURA 1 – Divisão da folha de citros para isolamento de microrganismos endofíticos após inoculação na região 3 (A3 e B3).

Como controle positivo da permanência do inóculo sobre a folha, com 45 dias de inoculação do transformante na planta foi retirada uma folha com inoculação e sem realizar limpeza superficial colocada em placa de Petri com meio de cultura BDA pH 6,8 acrescidos de tetraciclina 100 µg/mL e higromicina 100 µg/mL e incubada a 28°C.

6.2.5 Análise dos Transformantes com Microscopia Fluorescente

As linhagens selvagens de *C. gloeosporioides* e as linhagens dos transformantes foram cultivadas por um período de 1 a 4 dias e submetidas à análise de microscopia de epifluorescência. As imagens foram capturadas para análise dos resultados usando um microscópio Leica UV (DMKLB ou MZFL111) com filtros de 488 nm de excitação e emissão de 515 nm.

6.2.6 Análise dos Transformantes por PCR

Para a extração do DNA genômico total, os isolados foram cultivados por 3 dias em placa de Petri contendo meio BDA pH 6,8 sob temperatura de 28°C, no claro. O micélio foi coletado e o DNA genômico foi obtido utilizando o Microbial

DNA Isolation Kit (12224-5 - Mo Bio Laboratories) de acordo com as instruções do fabricante.

Para detecção dos transgenes em *Colletotrichum gloeosporioides* por PCR, a reação foi realizada em termociclador (Mastercycler, Eppendorf®) usando os oligonucleotídeos hph1 (5'AGCGTCTCCGACCTGATG3) hph2 (5'CGACGGACGCACTGACGG3') (MALONEK e MEINHARDT 2001). Para reação foi utilizado 10 ng de DNA total de *C. gloeosporioides* transformado, 50 mM de MgCl₂, 10 mM dNTP's (Invitrogen®), tampão de PCR 10 X, 10 µM de cada *primer* e 5U/ul de *Taq* polymerase (Invitrogen®). A PCR foi realizada com desnaturação inicial a 94° C por 5 minutos; 30 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 55°C, 30 segundos a 72°C; seguida de extensão final de 7 minutos a 72°C.

Após a amplificação, os produtos das PCRs foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão TBE juntamente com marcador de peso molecular 100 bp DNA *Ladder* (Invitrogen®). A corrida eletroforética foi realizada a corrente constante de 3 volts/cm por 2 horas. As bandas de amplificação foram coradas com GelRed e visualizadas em transiluminador ultravioleta e fotodocumentadas.

6.3 Resultados

6.3.1 Agrotransformação

Foram obtidos 18 transformantes do isolado LGMF540.

6.3.2 Caracterização e Seleção do Isolado Transformado

Os isolados analisados foram caracterizados como mostra a tabela 1.

O isolado LGMF 540-tDsRed1 foi selecionado para os experimentos de inoculação em plantas de citros uma vez que suas características morfológicas foram mais semelhantes ao selvagem não agrotransformado.

TABELA 1 – Caracterização dos isolados analisados

Isolado	Coloração da colônia	Velocidade de crescimento micelial (mm/dia)	Diâmetro da colônia (mm)	Taxa de esporulação (10 ⁵ /mL)
LGMF 540 Selvagem	alaranjada	1,10	75,9	Sim
LGMF 540-tDsRed1	alaranjada	1,15	76,1	Sim
LGMF 540-tDsRed2	alaranjada	1,025	72,4	Sim
LGMF 540-tDsRed3	Cinza	1,025	83,4	Não
LGMF 540-tDsRed4	Cinza	1,055	82,3	Não
LGMF 540-tDsRed5	Alaranjada	1,10	73,6	Sim
LGMF 540-tDsRed6	Alaranjada	0,98	74,6	Sim
LGMF 540-tDsRed7	Alaranjada	0,98	73,4	Sim
LGMF 540-tDsRed8	Alaranjada	1,04	77,8	Sim
LGMF 540-tDsRed9	Alaranjada	1,01	76,8	Sim
LGMF 540-tDsRed10	Cinza	0,975	84,5	Não
LGMF 540-tDsRed11	Cinza	1,045	80,8	Não
LGMF 540-tDsRed12	Cinza	0,94	84,0	Não
LGMF 540-tDsRed13	Cinza	0,96	82,1	Não
LGMF 540-tDsRed14	Cinza	0,97	82,3	Não
LGMF 540-tDsRed15	Cinza	0,95	84,0	Não
LGMF 540-tDsRed16	Cinza	0,95	81,4	Não
LGMF 540-tDsRed17	Cinza	0,97	80,9	Não
LGMF 540-tDsRed18	Cinza	0,96	82,5	Não

6.3.3 Inoculação de Folhas Cítricas

Nos isolamentos realizados aos 7, 14 e 21 dias após a inoculação do isolado LGMF540-Dsred1, não houve crescimento de *C. gloeosporioides* nos frágmentos foliares analisados.

No entanto, 28º dia após a inoculação do transformante, houve isolamento de *C. gloeosporioides* a partir dos frágmentos 3 (local de inoculação), 4 e 5 em ambos os lados da nervura foliar.

Igualmente, houve o isolamento de *C. gloeosporioides* a partir da folha sem desinfestação superficial 45 dias após inoculação, proveniente do local da folha onde foi realizada a inoculação.

6.3.4 Análise dos Transformantes com Microscopia Fluorescente

Todos os isolados analisados cresceram em meio seletivo (contendo higromicina) e apresentaram fluorescência vermelha (Figura 2), comprovando ser o transformado inoculado (LGMF540-DsRed1).

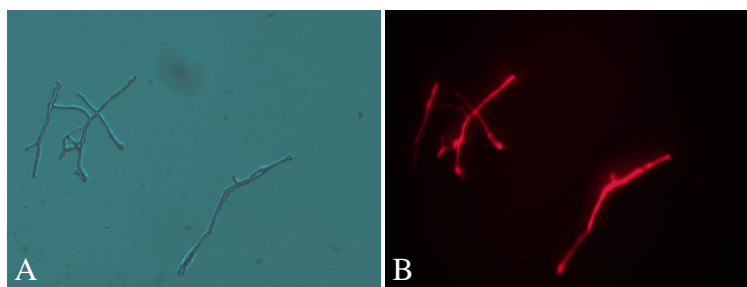


FIGURA 2 – Fotomicrografia da linhagem LGMF540-DsRed1 isolado do fragmento 3A, 28 dias após inoculação em folhas de citros. A: Microscopia em campo claro; B: Microscopia de epifluorescência.

6.3.5 Análise dos Transformantes por PCR

O DNA de todos os transformantes resistentes a higromicina B, confirmados como mitoticamente estáveis e apresentando emissão de fluorescência vermelha, tiveram o DNA genômico extraído e a presença do gene de resistência à higromicina confirmada por PCR (Figura 3). Com o uso dos iniciadores *hph1* e *hph2* foi possível obter um fragmento do tamanho esperado de aproximadamente 500pb que corresponde ao gene *hph*. A linhagem selvagem não apresentou nenhum produto de amplificação.

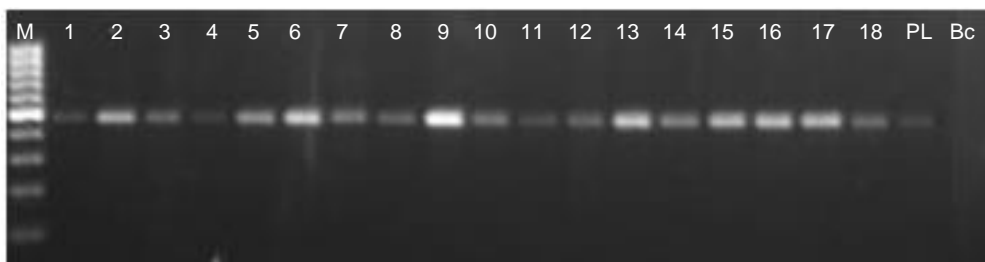


FIGURA 3: Eletroforese em gel de agarose da reação de amplificação do gene *hph* com os *primers hph1* e *hph2*.

Nota: Isolados transformados numerados de 1 a 18, PL: Plasmídio: DNA do plasmídio PCAMDsRed (controle positivo). M: Marcador de peso molecular Ladder de 100 pb. Bc: sem DNA (controle negativo).

6.4 Discussão

A agrotransformação do isolado de *C. gloeosporioides* LGMF 540 utilizado nesse trabalho obteve sucesso em receber o plasmídeo contendo o gene repórter Dsred, pela utilização do protocolo modificado de Figueiredo e colaboradores (2010) descrito para agrotransformação de isolados de *Guignardia citricarpa* via *A. tumefaciens*. Desta forma, a aplicação desse protocolo com as modificações utilizadas se mostrou eficiente para a agrotransformação de isolados de outra espécie, como *C. gloeosporioides*.

A doença PFC tendo como agente epidemiológico o fungo *C. acutatum* e recentemente tendo sido associado também o fungo *C. gloeosporioides* causando sintomas da doença em flores (LIMA *et al.*, 2012). Desta forma se mostra importante a identificação do modo de ação dos diferentes fungos em relação ao processo de infecção a fim de se avaliar o melhor mecanismo de controle de ambos os agentes causais nos pomares de citros.

Dessa forma, foi realizado neste trabalho a inoculação de um isolado de *C. gloeosporioides* endofítico de citros e agrotransformado para a expressão da proteína DsRed, a fim de avaliar se ocorre colonização deste fungo em folhas de citros, semelhante ao que ocorre em fungos endofíticos, ou se o mesmo permanece latente em folhas de citros, apenas no local de infecção. Nos estudos de interação fungo-planta a transformação genética mediada por *A. tumefaciens* pode contribuir para o estudo da biologia da interação entre fungos endofíticos e a planta hospedeira por meio da transferência de genes repórteres e monitoramento

da expressão desses genes durante os estágios de colonização do tecido hospedeiro. Os genes chamados de repórteres, sob condições apropriadas, promovem uma mudança na coloração de estruturas do fungo, e assim permitem a visualização fácil de aspectos que se deseja estudar.

Assim, nas inoculações realizadas com o isolado agrotransformado LGMF540-DsRed1 em folhas de citros, a recuperação dos mesmos por meio de reisolamento se deu seguindo protocolo para obtenção de isolados endofíticos. E a correta identificação destes isolados somente foi possível uma vez que foi utilizada uma linhagem com expressão do gene para codificação da proteína DsRed. Assim, foi realizada a distinção da linhagem inoculada com outros endofíticos que poderiam estar presentes em tais plantas.

A linhagem LGMF540-DsRed1 foi reisolada a partir dos fragmentos 3 (local da inoculação), 4 e 5 (fragmentos em direção ao pecíolo foliar) 28 dias após inoculação. Tais isolamentos sugerem que o fungo *C. gloeosporioides* inoculado penetrou no tecido foliar e colonizou de forma endofítica este tecido cítrico. Ainda, pode-se sugerir que houve colonização em direção ao pecíolo foliar, uma vez que os isolados foram obtidos a partir dos fragmentos 4 e 5 e não dos fragmentos 1 e 2. Caso a linhagem inoculada não colonizasse a folha de citros, este somente iria ser recuperado a partir do fragmento 3, onde houve a inoculação inicial.

Dos Santos (2013) utilizou fungos endofíticos (*Diaporthe terebinthifolii* e *Diaporthe endophytica*) isolados de folhas de *Schinus terebinthifolius* (Aroeira Vermelha) e de *Maytenus ilicifolia* (espinheira-santa) agrotransformados e expressando a proteína DsRed em inoculações de mudas de citros. Houve recuperação dos isolados agrotransformados 14 e 28 dias após inoculação em mudas de citros. Por outro lado, quando Goulin (2013) utilizou a mesma estratégia para avaliar a capacidade de linhagens agrotransformadas (GFP) do fitopatógeno *Phyllosticta citricarpa* em colonizar folhas de mudas de citros, houve apenas o reisolamento a partir de fragmentos foliares no ponto de inóculo. Os autores demonstraram assim, que o fungo não coloniza plantas de citros, mas permanece latente subcuticular no ponto de inóculo. Percebe-se pelos resultados obtidos por Dos Santos (2013) com fungo endofítico e por Goulin (2013) com um fitopatógeno, que os processos de infecção e colonização das plantas seguem diferentes padrões, revelando que fungos endofíticos colonizam as plantas de forma

assintomática enquanto fitopatógenos permanecem latentes, sem apresentar colonização.

Seguindo tais observações, o padrão apresentado pela linhagem transformada de *C. gloeosporioides*, sugere que este se assemelha mais a um fungo endofítico do que a um patógeno latente.

Sabe-se que *C. acutatum* sobrevive entre as floradas de citros na superfície das folhas, ramos ou nos cálices persistentes resultantes da florada anterior, na forma de apressório quiescente (TIMMER & BROWN, 2000; ZULFQAR; BRANSKY; TIMMER, 1996). O apressório é estimulado a germinar por meio da água de lavagem das flores, formando conídios, os quais são dispersos atingindo novas flores, que serão infectadas num período de 12 a 18 horas. A penetração ocorre diretamente nas pétalas, sem a formação do apressório, reiniciando o ciclo de infecção. (AGOSTINI; TIMMER, 1994; TIMMER *et al.*, 1994; ZULFQAR *et al.*, 1996). Dessa forma, a severidade da doença é altamente correlacionada com a quantidade e intensidade de chuva (TIMMER, GARNSEY; GRAHAM, 2000).

Uma vez que para *C. acutatum* há necessidade de molhamento para o desenvolvimento do processo de infecção e disseminação do patógeno durante o período de floração e tendo no presente trabalho sido analisado o fungo da espécie *C. gloeosporioides* endofítico de citros e a abordagem molhamento não ter sido empregada; se pode sugerir que houve colonização a 28 dias após a inoculação, em virtude da falta de molhamento. É possível que em testes realizados com molhamento o processo de infecção ocorra de modo precoce, sendo necessários maiores estudos para confirmação.

E experimentos futuros também é recomendado que sejam avaliados paralelamente os processos de infecção e colonização de *C. gloeosporioides* e do patógeno *C. acutatum*.

6.5 Conclusão

O protocolo de agrotransformação utilizado foi eficiente para fungos da espécie *C. gloeosporioides*;

Houve penetração e colonização de folhas de citros por linhagem agrotransformada de *C. gloeosporioides* obtida como endofítica de citros, 28 dias após inoculação.

6.6 Referências bibliográficas

AGOSTINI, J.P., GOTTWALD, T.R.; TIMMER, L.W. Temporal and spatial dynamics of postbloom fruit drop of citrus in Florida. *Phytopathology* 83:485-490. 1993.

BRASILEIRO, A. C. M. Cultivo e conservação de *Agrobacterium*. Manual de Transformação Genética de Plantas. Brasília: EMBRAPA, cap4: p.65-74. 1998.

BRASILEIRO, A. C. M.; LACORTE, C. Interação *Agrobacterium* –hospedeiro. Manual de Transformação Genética de Plantas. EMBRAPA: cap5: p. 75- 92. 1998.

BROWN, A.E.; SREENIVASAPRASAD, S.; TIMMER, L.W. Molecular characterization of slow-growing orange and key lime anthracnose strains of *Colletotrichum* from citrus as *C. acutatum*. *Phytopathology* 86(5):523-527.1996.

DOS SANTOS, P. J. C. Agrotransformação de duas novas espécies de *Diaporthe* e sua aplicação no control biológico de *Phyllosticta citricarpa*. Dissertação de Mestrado em Genética. Universidade Federal do Paraná. 2013.

CITOVSKY, V.; KOZLOVSKY, S. V.; LACROIX, B.; ZALTSMAN, A.; DAFNY-YELIN, M.; VYAS, S.; TOVKACH, A.; TZFIRA, T. Biological systems of the host cell involved in *Agrobacterium* infection. *Cellular Microbiology*, Oxford, v. 9, p. 9-20, 2007.

ECKERT, M.; MAGUIRE, K.; URBAN, M.; FOSTER, S.; FITT, B.; LUCAS, J.; HAMMOND-KOSACK, K. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Leptosphaeria* spp. and *Oculimacula* spp. with the reef coral gene DsRed and the jellyfish gene gfp. *Harpenden: Fems Microbiology Letters*, p. 253, v. 67-74, 2005.

FAGAN, H.J. Postbloom fruit drop of citrus, a new disease of citrus associated with a form of *Colletotrichum gloeosporioides*. *Annual Applied Biology*, London, v.91, n.1, p.13-20, 1979.

FAGAN, H.J. Postbloom fruit drop of citrus in Belize: II. Disease control by aerial ground spraying. *Turrialba* 34(2): 179-186. 1984.

FÁVARO, L. C. L. Diversidade e interação de *Epicoccum* spp. com cana-de-açúcar (*saccharum officinarum*,L.)2009. 219p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

FEICHTENBERGER, E. Queda de frutos jovens e citros, doença induzida por uma raça virulenta do fungo *Colletotrichum gloeosporioides*. Laranja 12(2): 513-521.1991.

FEICHTENBERGER, E., MÜLLER, G.W., GUIRADO, N. Doenças dos citros (*Citrus* spp). In: KIMATI, H., AMORIM, L., BERGAMIN, A.F., CAMARGO, L.E.A., REZENDE, J.A.M. Manual de Fitopatologia. 3.ed. São Paulo: Agronômica Ceres, v.2, p.280-284, 1997.

FIGUEIREDO, J. G.; GOULIN, E. H.; TANAKA, F.; KAVA-CORDEIRO, V.; GALLITERASAWA, L.; STAATS,C.; SCHRANK, A.; GLIENKE, C. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Guignardia citricarpa*. Journal of Microbiology Methods, 2010.

GOULIN, E. H. Caracterização Genética de Isolados Agrotransformados de *Phyllosticta citricarpa* e Indução de Sintomas de Mancha Preta dos Citros em Frutos. Dissertação de Mestrado em Genética. Universidade Federal do Paraná. 2013.

KADO, C. I. Molecular mechanisms of crows gall tumorigenesis. Critical Review in Plant Science, Philadelphia, v. 10, p. 1-32, 1991.

LACROIX, B.; TZFIRA, T.; VAINSTEIN, A.; CITOVCKY, V. A case of promiscuity: *Agrobacterium*'s endless hunt for new partners. Trend in Genetics, Cambridge, v. 22, p. 29-37, 2006.

LIMA, W. G.; SPÓSITO, M. B.; AMORIM, L.; GONÇALVES, F.P.; FILHO, P. A. M. *Colletotrichum gloeosporioides*, a new causal agent of citrus post-bloom fruit drop. European Journal of Plant Pathology, v. 131, p. 157-165, 2011.

MALONEK, S.; MEINHARDT, F. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation of the phytopathogenic ascomycete *Calonectria morganii* . Current Genetic. v. 40, n. 2, pág. 152–155, 2001.

MICHIELSE, C.; HOOYKAAS, P.; VAN DEN HONDEL, C.; RAM, A. *Agrobacterium*–mediated transformation as a tool for functional genomics in fungi. Current Genetics, Berlin, v. 48, p. 1-17, 2005.

NAKAMURA, M.; KUWAHARA, H.; ONOYAMA, K.; IWAI, H. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation for investigating pathogenicity genes of the phytopathogenic fungus *Colletotrichum sansevieriae*. Current Microbiology 65(2):176-182.2012.

PETRINI, O. Fungal endophytes of tree leaves. In: ANDREWS, J. H.; HIRANO, S. S. Microbial Ecology of Leaves. New York: Springer-Verlag, p. 179-197. 1991.

STAFFORD, H. A. Crown gall disease and *Agrobacterium tumefaciens* : a study of the history, present knowledge, missing information, and impact on molecular genetics. Botanical Review, New York, v. 66, p. 101-118, 2000.

TIMMER, L.W., AGOSTINI, J.P., ZITKO, S.E., ZULFIQAR, M. Postbloom fruit drop, a increasingly prevalent disease of citrus in the Americas. Plant Disease,78, n.4, p.329- 334, 1994.

TZFIRA, T.; CITOVSKEY, V. *Agrobacterium* –mediated genetic transformation of plants: biology and biotechnology. Current Opinion in Biotechnology, Philadelphia, v. 17, p. 147-154. 2006.

WACULICZ-ANDRADE, C. E.; BINI, A. P.; ADAMOSKI, D.; GOULIN, E. H.; GALLITERASAWA, L.V.; KAVA-CORDEIRO, V.; SPÓSITO, M. B.; GLINEKE, C. *Colletotrichum gloeosporioides stricto sensu* coloniza endofiticamente plantas de citros e da vegetação espontânea e participa da epidemiologia da doença PFC em pomares cítricos do Estado de São Paulo, em preparação. 2013

WEI, X.; ZHU, B. An efficient and stable method for the transformation of *Sclerotinia sclerotiorum*. Journal of Microbiology Methods, Amsterdam, v. 65, p. 202-207, 2007.

7 Discussão

O Brasil sendo o maior produtor mundial de laranja, responsável por 50% da produção de suco da laranja, tendo no setor agrícola uma grande movimentação financeira, além da geração de vários empregos diretos e indiretos não pode estar sujeito a grandes perdas como as causadas pela doença Podridão Floral dos Citros.

Esta doença ocorre nos trópicos e subtropicais úmidos das Américas, em locais que propiciam mais de uma floração dos citros (*Citrus* spp.), especialmente em variedades que florescem mais de uma vez por ano, favorecendo assim o surgimento da doença. A PFC está presente em regiões do estado de São Paulo onde as condições climáticas são favoráveis, sendo dessa forma local de maior suscetibilidade à ocorrência de epidemias. No entanto, há relatos de que estas epidemias ocorrem de modo inesperado e explosivo, sem se identificar a fonte inicial para a disseminação da doença em locais onde antes não estava presente.

Os locais com características favoráveis para o aparecimento da doença vinham sendo evitados pelos citricultores para o plantio de variedades susceptíveis. No entanto o aparecimento de outras doenças de citros como o HLB (“Huang Long Bing”) ou “Citrus Greening”, relatado pelo Centro APTA Citros “Sylvio Moreira” - IAC - (Instituto Agrônomo de Campinas) e o Fundecitrus desde 2004, tem obrigado a migração dos pomares cítricos para regiões antes não utilizadas. Assim, é emergente a localização de áreas onde o fungo patogênico *C. acutatum* ou *C. gloeosporioides* não estejam presentes, indicando possíveis locais para a migração das culturas citrícolas, evitando assim o aparecimento da doença e as perdas econômicas geradas.

Esta doença é causada por dois fungos do mesmo gênero, *Colletotrichum acutatum* e *C. gloeosporioides*. No entanto, não há relatos na literatura da presença de linhagens patogênicas de forma endofítica nestas plantas. A ocorrência dessa doença em locais sem histórico da PFC têm intrigado produtores e pesquisadores, principalmente no que se refere à origem do inóculo inicial. Há apenas um relato acerca da sobrevivência de *C. acutatum* em plantas cítricas, segundo o qual, apressórios do fungo permanecem na superfície das folhas entre as florações (ZULFIQAR, 1996). No entanto, essa hipótese não explica a ocorrência de severas epidemias em pomares isentos da doença. Por outro lado,

não está claro na literatura se estes fungos se apresentam como patógenos latentes em plantas cítricas entre as floradas ou mesmo em plantas da vegetação espontânea em pomares cítricos, contribuindo como reservatório de inóculo para a disseminação da doença.

Desta forma, ao ser realizada a investigação de isolados endofíticos de citros e da vegetação espontânea visando verificar a ocorrência de colonização com linhagens não patogênicas de *C. acutatum* e *C. gloeosporioides*, foram identificados isolados apenas da espécie *C. gloeosporioides stricto sensu*. E tendo estes isolados sido sequenciados 5 regiões gênicas as quais permitiram comparação com sequências utilizadas para o estudo o qual foi capaz de delimitar com precisão diferentes espécies dentro do complexo de espécies *C. gloeosporioides*, pode-se afirmar com certeza que os fungos identificados neste trabalho são da espécie *C. gloeosporioides*.

O teste de patogenicidade revelou um isolado com capacidade de realizar sintomas da PFC em flores de citros, e sendo este de origem endofítica de folha de citros, pode-se inferir que as folhas de citros são capazes de conter endofíticos com a habilidade de desenvolver a doença.

Desta forma, até o momento não se pode afirmar um possível local para a migração dos pomares de citros, pois tendo sido identificado um fungo endofítico causador de sintoma de PFC, e sendo a presença de fungos endofíticos um acontecimento bem comum em diferentes grupos de plantas, não se pode assegurar até o momento um local onde este fungo não se encontre como endofítico e que possa causar o sintoma da PFC. Havendo necessidade de testes para a verificação da patogenicidade do isolados *C. gloeosporioides* de outras plantas em flores de citros para se verificar a potencialidade de causar sintomas da doença.

Ao se comparar o par de *primers* ITS4/CgInt frequentemente utilizado em diversos estudos para amplificação por PCR a fim de se identificar os isolados como pertencentes à espécies *C. gloeosporioides*, foi possível verificar que o *primer* CgInt, não identifica a espécie *C. gloeosporioides stricto sensu* e sim algumas espécies dentro do complexo de espécie *C. gloeosporioides*. De modo que outras espécies já caracterizadas por Weir *et al.*, (2012) amplificam com este mesmo *primer*. Assim, pela análise do alinhamento multigênico, foi possível identificar duas sequências únicas para a espécie *C. gloeosporioides*, nos genes

calmodulina e GPDH, permitindo o desenho de primers específicos para a identificação precisa dessa espécie apenas com a utilização de PCR, sem a necessidade de serem sequenciadas diferentes regiões do genoma.

Na comparação das sequências parciais do gene 18S e da região ITS1-5,8S-ITS2 do rDNA dos 189 isolados sequenciados, foi possível identificar uma região variável de 22 nucleotídeos separando os isolados em dois grupos distintos. Pode-se verificar que essa região de variação provoca uma alteração na conformação do RNA ribossômico 18S por interação diferenciada entre seus ribonucleotídeos. A esta diferença entre os RNAs ribossômicos não foi possível realizar nenhuma inferência quanto as características ou atividades das células do fungo, no entanto, uma região de 22 nucleotídeos presente em uma região responsável pela formação dos RNAs ribossômicos deve ter sua importância, até o momento ainda não claramente estabelecida.

Sendo identificado o agente causal da doença PFC como um fungo, é natural que a escolha dos produtores para o combate a doença seja na grande maioria dos casos associada a utilização de fungicidas, sendo um dos mais utilizados o carbendazim, aplicado com frequência e há bastante tempo em pomares de citros. Dessa forma, os testes de resistência ao fungicida carbendazim terem tido como resultado isolados altamente resistentes vem corroborar com a hipótese de que a aplicação por longos períodos gera isolados resistentes (BRENT, 2007). Outro fungicida mais recente em sua aplicação em culturas de citros é o triazol, no entanto, já foi possível identificar alteração na tolerância dos isolados de *C. gloeosporioides* ao fungicida triazol, sendo necessária uma concentração dez vezes maior para CE_{50} e duas vezes maior para CMI para se alcançar o mesmo resultado obtido para fungos *C. acutatum*, quando se comparam as duas espécies de *Colletotrichum*.

Interessante notar que as alterações frequentemente associadas entre isolados resistentes e mutação realizadas em diferentes estudos, não foram verificadas com os isolados testados neste trabalho. Podendo este fato estar associado a uma necessidade de verificação dos isolados referidos por outros estudos pertencerem realmente a espécie *C. gloeosporioides stricto sensu*, definida em 2012 por Weir *et al.* Desta forma, quando se fizer comparações de estudos anteriores ao trabalho citado, convém analisar com cuidado se as espécies a

serem comparada pertencem de fato a mesma espécie a ser analisada para não se causar ainda mais confusão na literatura.

Foi possível identificar no sequenciamento realizado com o gene da *β -tubulina* a presença de regiões com mutações silenciosas, sem a alteração do aminoácido inserido no polipeptídeo. No entanto, uma vez que já foram relatados em diferentes estudos a capacidade destas mutações em causar alterações celulares, é um ponto a se ter atenção. Não sendo possível até o momento a identificação de qual consequência esse achado traz para a célula, devendo maiores investigações serem realizadas para a funcionalidade destas mutações.

Estudos da interação que ocorre entre plantas e fungos são importantes para se tentar desvendar como o processo de patogenicidade ocorre, pois uma vez que esse processo é estabelecido o mecanismo de controle e as medidas de combate ao patógeno, se dá de maneira mais fácil.

Neste trabalho, foi possível perceber que o fungo endofítico testados foi capaz de penetrar e colonizar o tecido da folha 28 dias após ter sido inoculado, e assim indicar um possível mecanismo de ação do fungo para alcançar o interior da planta. Novos testes devem ser realizados a fim de se poder ver como esse processo ocorre em relação ao isolado endofítico que foi capaz de causar sintomas, para que se possa ter uma comparação do modo de ação do isolado apenas endofítico daquele que é endofítico e causador da doença PFC.

8 Conclusões Gerais

Os isolados endofíticos de plantas de citros e da vegetação espontânea analisados pertencem à espécie *C. gloeosporioides*, tendo sua precisa identificação com o uso de análise de filogenia multilocus.

Uma região de 22 nucleotídeos presente no último éxon do gene 18S do rDNA causa uma alteração na conformação do RNA ribossômico ainda sem funcionalidade estabelecida.

A patogenicidade de um isolado endofítico de plantas de citros da espécie *C. gloeosporioides* foi verificada em flores de citros causando sintoma de PFC, sendo a presença de *C. gloeosporioides* endofíticos de folhas de citros capaz de causar sintoma da PFC em flores seja a fonte de inóculo inicial para a proliferação da doença PFC em pomares sem histórico da doença.

O fungicida triazol analisado teve sua efetividade de controle diminuída em isolados de *C. gloeosporioides*, quando comparado com isolados de *C. acutatum*.

A correlação entre isolados de *C. gloeosporioides* altamente resistentes ao fungicida carbendazim e a análise da presença de mutações na sequência parcial do gene da β -tubulina não foi estabelecida. No entanto, foi possível identificar 6 regiões onde ocorrem mutações silenciosas, até o momento sem associação com resistência ou identificação de sua funcionalidade.

Mutações relacionadas a *C. gloeosporioides* em trabalhos anteriores ao estudo de Weir *et al.* (2012), podem estar se referindo a diferentes espécies pertencentes ao Complexo de espécies *C. gloeosporioides* e não a espécie *C. gloeosporioides stricto sensu*.

O protocolo de agrotransformação utilizado foi efetivo para fungos da espécie *C. gloeosporioides*, possibilitando a visualização da penetração e colonização de folhas de citros por conídios de fungos *C. gloeosporioides* endofíticos de citros após 28 dias de inoculação.

9 Referências

ABANG, M.M.; WINTER, S.; GREEN, K.R.; HOFFMANN, P.; MIGNOUNA, H.D.; WOLF, G.A. Molecular identification of *Colletotrichum gloeosporioides* causing yam antracnose in Nigeria. *Plant Pathology*, Oxford, v.51, n9, p. 63-71, 2002.

ABELLO, J.; KELEMU, S.; GARCIA, C. *Agrobacterium*-mediated transformation of the endophytic fungus *Acremonium implicatum* associated with *Brachiaria* grasses. *Mycological Research*, Cambridge, v. 112, p. 407-413. 2008.

ADELMAN, A. N.; ANDERSON, M. A. E.; MORAZZANI, E. M.; MYLES, K. M. A transgenic sensor strain for monitoring the RNAi pathways in the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. *Insect Biochemistry Biology*, v. 38, p. 705-713. 2008.

AFANADOR-KAFURI, L., MINZ, D., MAYMON, M.; FREEMAN, S. Characterization of *Colletotrichum* isolates from tamarillo, passiflora, and mango in Colombia and identification of a unique species from the genus. *Phytopathology* 93:579-587. 2003.

AGOSTINI, J.P.; TIMMER, L.W. Population dynamics and survival of *Colletotrichum gloeosporioides*, the cause of citrus postbloom fruit drop. *Phytopathology* 82: 1084. 1992.

AGOSTINI, J.P., GOTTWALD, T.R.; TIMMER, L.W. Temporal and spatial dynamics of postbloom fruit drop of citrus in Florida. *Phytopathology* 83:485-490. 1993.

AGRIOS, G.N. Plant disease caused by fungi. *Plant Pathology*, London, p. 245-406. 1997.

ALBERTS, B.; LEWIS, J.; RALF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J.D. *Molecular Biology of the Cell*. 3rd ed. New York: Garland Publishing. 1994.

AMEY, R.C.; ATHEY-POLLARD, A.; BURNS, C.; MILLS, P.R.; BAILEY, A.; FOSTER, G.D. PEG-mediated and *Agrobacterium*-mediated transformation in the mycopathogen *Verticillium fungicola*. *Mycological Research*, Cambridge, v. 106, p. 4-11. 2002.

ANDRADE, E.M.; UESUGI, C.H.; UENO, B.; FERREIRA, M.A.S.U. Caracterização morfo cultural e molecular de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* patogênicos de mamoeiro. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.31, n. 1, p. 21-31, 2007.

ARNAUD, L.S.E.P.; SANTOS, C.D.G.; LIMA, J.A.A.; FEITOSA, F.A.A. Predominância de Begamovírus em tomateiros na região produtora de Ibiapaba, Ceará, e sua detecção natural em plantas daninhas. *Fitopatologia Brasileira*, 32 (3): 241-246. 2007.

ARX, J.A. von. Die Arten der Gattung *Colletotrichum* Cda. *Phytopathologische Z.* 29:413– 468. 1957a.

ARX, J.A. von. Revision der zu *Gloeosporium* Gestellten Pilze. *Verh. K. Ned. Akademie Wetenschappen Amst.* 51:1–153. 1957b.

ATKINS, S. D.; CLARK, I.M. Fungal molecular diagnostics: a mini review. *Journal of Applied Genetics*, 45(1): 3-15. 2004.

AZEVEDO, J.L.; JÚNIOR, W.M.; PEREIRA, J.O; ARAÚJO, W.L. Endophytic microganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. *Environmental Biotechnology*, vol. 3, nº1, p. 40-65, 2000.

AZEVEDO, J.L.; SERAFINE, L.A.;BARROS. N.M. Microrganismos endofíticos e seu papel em plantas tropicais. In: L.A. SERAFINE; N.M. BARROS e J.L. AZEVEDO. *Biotecnologia: Avanços na Agricultura e na Indústria*. Editora Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, 2002. Cap 08, pp.233-265, 2002.

AZEVEDO, J. L. Microrganismos endofíticos. In: MELO, I. S.;AZEVEDO, J. L. de (Eds.). *Ecologia Microbiana*. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPMA, p. 117-137, 1998.

BACON, C.W.;WHITE Jr.;J.F. *Microbial endophytes*. New York: Marcel Dekker, 487p, 2000.

BALZERGUE, S.; DUBREUCQ, B.; CHAUVIN, S.; Le CLAINCHE, I.; Le BOULAIRE, F.; de ROSE, R.; SAMSON, F.; BIAUDET, V.; LECHARNY, A.;CRUAUD, C.; WEISSENBAACH, J.; CABOCHE, M.; LEPINIEC, L. Improved PCR-walking for large-scale isolation of plant T-DNA borders, *Biotechniques*, New York, v. 30, p. 496-498. 2001.

BATISTA, M.F. Planta silvestres hospedeiras de *Colletotrichum guaranicola*. In: *Simpósio Brasileiro do Guaraná. Anais. Embrapa-UEPAE de Manaus*, 409-411. 1984.

BAILEY, A. J.; JEGER, J. M. *Colletotrichum*: biology, pathology and control. Oxford: British Society for Plant Pathology, p.88-120. 1992.

BELL, A.A.; WHEELER, M.H. Biosynthesis and functions of fungal melanins. Annual Review of Phytopathology, Palo Alto, v.24, p. 411-451, 1986.

BERNSTEIN, M. E.; CARROLL, G. C. Internal fungi in old-growth Douglas fir foliage. Canadian Journal of Botany, Ottawa, v.55, n.6, p.644-653, 1977.

BRASILEIRO, A.C.M. Cultivo e conservação de *Agrobacterium*. Manual de Transformação Genética de Plantas. Brasília: EMBRAPA, cap.5: p. 65-74. 1998.

BRASILEIRO, A.C.M.; LACORTE, C. Interação *Agrobacterium*-hospedeiro. Manual de Transformação Genética de Plantas. Brasília: EMBRAPA, cap.5: p. 75-92. 1998.

BOURETT, T. M.; HOWARD, R. J. In vitro development of penetration structures in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. Canadian Journal of Botany, Ottawa, v.68, p.329-342, 1990.

BUNDOCK, P.; DENDULKRAS, A.; BEIJERSBERGEN, A.; HOOYKAAS, P.J.J. Trans-kingdom T-DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to *Saccharomyces cerevisiae*. EMBO Journal, Oxford v. 14, p. 3206-3214. 1995.

BRENT, K. J. Fungicide resistance in crop pathogens: How can it be managed? Fungicide Resistance Action Committee, Monograph No. 1. 2007.

BROWN, A.E.; SREENIVASAPRASAD, S.; TIMMER, L.W. Molecular characterization of slow-growing orange and key lime anthracnose strains of *Colletotrichum* from citrus as *C. acutatum*. Phytopathology 86(5):523-527. 1996

BUSSABAN, B., LUMYONG, S., LUMYONG, P., MCKENZIE, E.H.C.; HYDE, K.D. Endophytic fungi from *Amomum siamense*. Canadian Journal of Microbiology 47: 1-6, 2001.

CABRAL, D.; STONE, J.K.; CARROLL, G.C. The internal mycobiota of *Juncus* spp: microscopic and cultural observations of infections patterns. Mycological Research 97:367-376, 1993

CALHOUN, L. A.; FINDLAY, J. A.; MILLER, J. D.; WHITNEY, N. J. Metabolites toxic to spruce budworm from balsam fir needle endophytes. Mycological Research, Cambridge, v.96, n.4, p.281-286, 1992.

CAMPOY, S.; PEREZ, F.; MARTIN, J.F.; GUTIERREZ, S.; LIRAS, P. Stable transformants of the azophilone pigment-producing *Monascus purpureus* obtained by protoplast transformation and *Agrobacterium*-mediated DNA transfer, *Current Genetics*, Berlin, v. 43, p. 447-452. 2003.

CARROLL, G. C.; CARROLL, F. Studies on the incidence of coniferous endophytes in the Pacific Northwest. *Canadian Journal of Botany*, Ottawa, v.5, p.3034-3043, 1978.

CARROLL, G. C. Fungal endophytes in stems and leaves: from latent pathogen to mutualistic symbiont. *Ecology*, Brooklym, v.69, p. 2-9, 1988.

CHACÓN, M. R.; RODRÍGUEZ-GALÁN, O.; BENÍTEZ, T.; SOUSA, S.; REY, M.; LLOBELL, A.; DEGADO-JARANA, J. Microscopic and transcriptome analyses of early colonization of tomato roots by *Trichoderma harzianum*. *International Microbiology*, Madrid, v. 10, p. 19-27. 2007.

CHALFIE, M.; TU, Y.; EUSKIRCHEN, G.; WARD, M. M.; PRASHER, D. C. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*, Washington, v. 263, p. 802-805. 1994.

CHAVES, A.L.R.; BRAUN, M.R.; EIRAS, M.; COLARICCIO, A.; GALLETI, S. *Erigeron bonariensis*: Hospedeira Alternativa do *Lettuce mosaic virus* no Brasil. *Fitopatologia Brasileira*, 28: 307-311. 2003.

CHEN, G.; LYN, Y.; WEN, L.; VRIJMOED, L.L.P.; JONES, E.B.G. Two new metabolites of a marine endophytic fungus from an estuarine mangrove on the South China Sea Coast. *Tetrahedron* 59:4907-4909, 2003.

CHEN, H.-Q., DEKKERS, K. L., BURNS, J. K., TIMMER, L. W., AND CHUNG, K.-R.. valuation of growth regulator inhibitors for controlling post-bloom fruit drop (PFD) of citrus caused by *Colletotrichum acutatum*. *HortScience* 41:1317-1321. 2006.

CHUNG, K.-R., SHILTS, T., ERTÜRK, Ü., TIMMER, L. W., AND UENG, P. P.. Indole derivatives produced by the fungus *Colletotrichum acutatum* causing lime anthracnose and post-bloom fruit drop of citrus. *FEMS* 2003.

CHUNG, W.-H., ISHII, H., NISHIMURA, K., FUKAYA, M., YANO, K., AND KAJITANI, Y. Fungicide sensitivity and phylogenetic relationship of anthracnose fungi isolated from various fruit crops in Japan. *Plant Disease*. 90:506-512. 2006.

CHUNG, W. H.; CHUNG, W. C.; PENG, M. T.; YANG, H. R.; HUANG, J. W. Specific detection of benzimidazole resistance in *Colletotrichum gloeosporioides* from fruit crops by PCR-RFLP. *Biotechnology*. 27(1): 17-24. 2010.

CITOVSKY, V.; KOZLOVSKY, S.V.; LACROIX, B.; ZALTSMAN, A.; DAFNY-YELIN, M.; VYAS, S.; TOVKACH, A.; TSFIRA, T. Biological systems of the host cell involved in *Agrobacterium* infection. *Cellular Microbiology*. Oxford, v. 9, p. 9-20. 2007.

CLARK, C. L.; MILLER, J. D.; WHITNEY, N. J. Toxicity of conifer needle endophytes to spruce budworm. *Mycological Research*, Cambridge, v.93, p.508-512, 1989.

CLAY, K. Effects of fungal endophytes on the seed and seedling biology of *Lolium perenne* and *Festuca arundinacea*. *Oecologia*, Berlin, v.73, p.358-362, 1987.

CLEMENTE, S. L.; PIKE, K. S.; KAISER, W. J., WILSON, A. D. Resistance of endophyte-infected plants of tall fescue and perennial ryegrass to the Russian wheat aphid (Homoptera: Aphidae). *Journal of the Kansas Entomological Society*, Manhattan, v.63, n.4, p.646-648, 1990.

COBUCCI, T.; STEFANO, J.G.di; KLUTHCOUSKI, J. Manejo de plantas daninhas na cultura do feijoeiro em plantio direto. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, Circular Técnica 35, 56p. 1999.

COMBIER, J.P.; MELAYAH, D.; RAFFIER, C.; GAY, G.; MARMEISSE, R. *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation as a tool for insertional mutagenesis in the symbiotic ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum*. *FEMS Microbiology Letters*, Amsterdam, v. 220, p. 141-148. 2003.

COTTAGE, A.; YANG, A.; MAUNDERS, H.; de LACY, R.C.; RAMSAY, N.A. Identification of DNA sequences flanking T-DNA insertions by PCR walking. *Plant Molecular Biology Reporter*, Arizona, v. 19, p. 321-327. 2001.

COVERT, S.F.; KAPOOR, P.; LEE, M.; BRILEY, A.; NAIRN, C.J. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Fusarium circinatum*. *Mycological Research*, Cambridge, v. 105, p. 259-264. 2001.

CROUCH, J. A.; CLARKE, B.B.; HILLMAN, B.I. Unraveling evolutionary relationships among the divergent lineages of *Colletotrichum* causing anthracnose in turfgrass and corn. *Phytopathology* 96:46–60. 2006.

CROUCH, J.A; TREDWAY, L.P.; CLARKE, B.B.; HILLMAN, B.J. Phylogenetic and population divergence correspond with habitat for the pathogen *Colletotrichum cereale* and allied taxa across diverse grass communities. *Molecular Ecology* 18:123–135.2009.

DAMM, U.; WOUDEMBERG, J. H. C.; CANNON, P. F.; CROUS, P. W. *Colletotrichum* species with curved conidia from herbaceous hosts. *Fungal Diversity* 39: 45–87.2009.

DAMM, U.; CANNON, P. F.; WOUDEMBERG, J. H. C.; CROUS, P. W. The *Colletotrichum acutatum* species complex. *Studies in Mycology*. 73:37-113. 2012a.

DAMM, U.; CANNON, P. F.; WOUDEMBERG, J. H. C.; JOHNSTON, P. R.; WEIR, B. S.; TAN, Y. P.; SHIVAS, R. G.; CROUS, P. W. The *Colletotrichum boninense* species complex. – *Stud. Mycol.* 73: 1–36. 2012b.

DEAN, R.A. Signal pathways and appressorium morphogenesis. *Annual Review of Phytopathology*, Palo Alto, v. 35, p. 211-234, 1997.

DeGROOT, M.J.; BUNDOCK, P.; HOOYAAS, P.J.; BEIJERSBERGEN, A.G. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of filamentous fungi. *Nature Biotechnology*, London, v. 16, p. 839-842. 1998

DONADIO, L. C.; MOURÃO FILHO, F. A. A.; MOREIRA, C.S. Centros de origem, distribuição geográfica de plantas cítricas e histórico da citricultura no Brasil. In: MATTOS JÚNIOR, D.; DE NEGRI, J. D.; PIO, R. M.; POMPEU JÚNIOR, J. (ed.) *Citros*. Campina: Instituto Agrônômico e Fundag, p. 1-18. 2005.

DU, M.; SCHARDL, C. L.; NUCKLES, E. M.; VAILLANCOURT, L. J. Using mating-type gene sequences for improved phylogenetic resolution of *Colletotrichum* species complexes. *Mycologia* 97:641–658.2005.

ECKERT, M.; MAGUIRE, K.; URBAN, M.; FOSTER, S.; FITT, B.; LUCAS, J.; HAMMOND-KOSACK, K. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Leptosphaeria* spp. and *Oculimacula* spp. with the reef coral gene DsRed and the jellyfish gene gfp. *FEMS Microbiology Letters*, Amsterdam, v. 253, p. 67-74, 2005.

EZRA, D.; STROBEL, G. A. Effects of substrate on the bioactivity of volatile antimicrobials produced by *Muscodor albus*. *Plant Science*, St. Paul, v. 165, p.913-922, 2003.

FAGAN, H.J. Postbloom fruit drop of citrus, a new disease of citrus associated with a form of *Colletotrichum gloeosporioides*. Annual Applied Biology, London, v.91, n.1, p.13-20, 1979.

FAGAN, H.J. Postbloom fruit drop of citrus in Belize: II. Disease control by aerial ground spraying. Turrialba 34(2): 179-186. 1984.

FÁVARO, L.C.L. Diversidade e interação de *Epicoccum* spp com cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*, L.). Tese de Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

FEICHTENBERGER, E. Queda de frutos jovens e citros, doença induzida por uma raça virulenta do fungo *Colletotrichum gloeosporioides*. Laranja 12(2): 513-521. 1991.

FEICHTENBERGER, E., MÜLLER, G.W., GUIRADO, N. Doenças dos citros (*Citrus* spp). In: KIMATI, H., AMORIM, L., BERGAMIN, A.F., CAMARGO, L.E.A., REZENDE, J.A.M. Manual de Fitopatologia. 3.ed. São Paulo: Agronômica Ceres, v.2, p.280-284, 1997.

FEICHTENBERGER, E.; Doenças incitadas por *Phytophthora* em citros. In: LUIZ, E. D. M. N.; MATSUOKA, K.; SANTOS, A. F. (Ed.) Doenças causadas por *Phytophthora* no Brasil. Livraria Rural, Piracicaba, cap 10 p. 283 – 342, 2001.

FREEMAN, S., KATAN, T.; SHABI, E. Characterization of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose diseases of various fruits. Plant Disease 82:596-605. 1998.

FREEMAN, S.; HOROWITZ, S.; SHARON, A. Pathogenic and nonpathogenic lifestyle in *Colletotrichum acutatum* from strawberry and other plants. Phytopathology, Saint Paul, v.91, p. 986-992. 2001.

FIGUEIREDO J.G., PIMENTEL I.C., VICENTE V.A., PIE M.R., KAVA-CORDEIRO V., GALLI-TERASAWA L.V.; PEREIRA J.O., SOUZA A.Q.L.; GLIENKE, C; High diversity and bioprospecting endophytic *Pestalotiopsis* spp. with antibacterial properties from *Maytenus ilicifolia*, a medicinal plant from Brazil. Canadian Journal Microbiology 53: 1123-1132. 2007.

FIGUEIREDO, J.G.; GOULIN E.H.; TANAKA, F.; STRINGARI, D.; KAVACORDEIRO, V.; GALLI-TERASAWA, L.V.; STAATS, C.C.; SCHRANK, A.; GLIENKE, C. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Guignardia citricarpa*. Journal of Microbiological Methods v. 80, p. 143-147. 2010.

FISCHER, I. H.; LOURENÇO, S. A.; AMORIM, L. Doenças pós-colheita em citros e caracterização da população fúngica ambiental no mercado atacadista de São Paulo. Tropical Plant Pathology.33, 3, 219-226. 2008.

FITZGERALD, A.M.; MUDGE, A.M.; GLEAVE, A.P. PLUMMER, K.M. *Agrobacterium* and PEG-mediated transformation of the phytopathogen *Venturia inaequalis*. Mycological Research, Cambridge, v. 107, p. 803-810. 2003.

FNP Consultoria & Comércio. Citros. 2011. In – Agrianual 2011: anuário da agricultura brasileira. São Paulo, p.245-306, 2011.

GLIENKE-BLANCO, C. *Guignardia citricarpa* Kiely: Análise genética, cariotípica e interação com o hospedeiro. Piracicaba, Tese (Doutorado – área de Concentração: Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo. 1999.

GOES, A.; KIMATI, H. Caracterização morfológica de isolados de *Colletotrichum acutatum* e *C. gloeosporioides* associados à Queda Prematura dos Frutos Cítricos. Summa Phytopathologica, Jaboticabal, v. 23, n. 1, p. 4-9, 1997.

GOES, A.; GARRIDO, R.B.O.; REIS, R.F.; BALDASSARI, R.B.; SOARES, M.A. Evaluation of fungicide applications to sweet orange at different flowering stages for control of postbloom fruit drop caused by *Colletotrichum acutatum*. Crop Protection, Oxford, v. 27, n. 1, p. 71–76, 2008

GONG, X.; FU, Y.; JIANG, D.; LI, G.; YI, X.; PENG, Y.L-Arginine is essential for conidiation in the filamentous fungus *Coniothyrium minitans*. Fungal Genetics and Biology, Orlando, v. 44, p. 1368-1379. 2007.

GORFER, M.; KLAUBAU, S.; BANDIAN, D.; STRAUSS, J. *Cadophora finlandia* and *Phialocephala fortinii*: *Agrobacterium*-mediated transformation and functional GFP expression. Mycological Research, Cambridge, v. 111, p. 850-855. 2007.

GOUKA, R.J.; GERK, C.; HOOYKAAS, P.J.; BUNDOK, P.; MUSTERS, W.; VERRIPS, C.T. DE GROOT, M. J. Transformation of *Aspergillus awamori* by

Agrobacterium tumefaciens-mediated homologous recombination. Nature Biotechnology, London, v. 17, p. 598-601. 1999.

GUERBER, J. C., LIU, B., CORRELL, J. C. and JOHNSTON, P. R., 2003: Characterization of diversity in *Colletotrichum acutatum sensu lato* by sequence analysis of two gene introns, mtDNA and intron RFLPs, and mating compatibility. Mycologia, 95, 5: 872–895.

HALL, B. G. Phlogenetic Trees Made Easy: A How-to Manual for Molecular Biologists. Massachusetts U.S.A.: Sinauer Associates, Inc., 2001.

HASELOFF, J.; DORMAND, E. L.; BRAND, A. H. Live imaging with green fluorescent protein. In PADDOCK, S. (Ed.) Methods in Molecular Biology: confocal microscopy methods and protocols. New Jersey. Humana Press, p. 241-259. 1999.

HOROWITZ, S.; FREEMAN, S.; SHARON, A. Use of green fluorescent protein-transgenic strain to study pathogenic and nonpathogenic lifestyle in *Colletotrichum acutatum*. Phytopathology, 92, 743 – 749. 2002

HOWARD, R. J.; FERRARI, M. A. Role of melanin in a presporium function. Experimental Mycology, Orlando, v.13, p.403-418, 1989.

JEFFERSON, R. A.; KAVANAGH, T. A.; BEVAN, M. W. GUS fusion: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. The EMBO Journal, Oxford, v. 6, p. 3901-3907. 1987.

JEFFRIES, P., DODD, J.C., JEGER, M.J. AND PLUMBLEY, R.A. The biology and control of *Colletotrichum* species on tropical fruit crops. Plant Pathology 39: 343-366. 1990.

JOHRI, B.N. Endophytes to the rescue of plants! Current Science 90(10): 1315-1316, 2006.

KADO, C.I. Molecular mechanisms of crown gall tumorigenesis. Critical Review in Plant Sciences, Philadelphia, v. 10, p. 1-32. 1991.

KHANG, C.H.; PARK, S.Y.; LEE, Y.H.; KANG, S. A dual selection based, targeted gene replacement for *Magnaporthe grisea* and *Fusarium oxysporum*. Fungal Genetics and Biology, Orlando, v. 42, p. 483-492. 2005.

KUBO, Y.; TAKAMP, Y.; ENDO, N.; YASUDA, N.; TAJIMA, S.; FURUSAWA, I. Cloning and structural analysis of the melanin biosynthesis gene SCD1 encoding scytalone dehydratase in *Colletotrichum lagenarium*. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, n.12, p.4340-4344, 1996.

KUMAR, D.S.S.; HYDE, K.D. Biodiversity and tissue recurrence of endophytic fungi in *Tripterygium wilfordii*. *Fungal Diversity* 17: 69-90, 2004.

KUNIK, T.; TZAFIRA, T.; KAPULNIK, T.; GAFNI, Y.; DINGWALL, C.; CITOVISKY, V. Genetic transformation of HeLa cells by *Agrobacterium*. *Proceedings of National Academy of Sciences USA, Stanford*, v. 98, p. 1871-1876. 2001.

KUPPER, K. C.; GIMENES-FERNANDES, N.; GOES, A. Controle Biológico de *Colletotrichum acutatum*, Agente Causal da Queda Prematura dos Frutos Cítricos. *Fitopatologia Brasileira*, 2003.

LACORTE, C.; ROMANO, E. Transferência de vetores para *Agrobacterium*. In: BRASILEIRO, A.C.M.; CARNEIRO, V.T. (Org). *Manual de transformação genética de plantas*. Brasília: SPI/EMBRAPA, p. 93-109. 1998.

LACROIX, B.; TZAFIRA, T.; VAINSTEIN, A.; CITOVISKY, V. A case of promiscuity: *Agrobacterium*'s endless hunt for new partners. *Trends in Genetics, Cambridge*, v. 22, p. 29-37. 2006.

LAHEY K.A, YUAN R, BURNS J.K, UENG P.P, TIMMER LW.; CHUNG KR Induction of phytohormones and differential gene expression in citrus flowers infected by the fungus *Colletotrichum acutatum*. *Mol Plant-Microbe Interact* 17: 1394-1401. 2004.

LATCH, C. G. M.; CHRISTENSEN, M. J. Artificial infection of grasses with endophytes. *Annals of Applied Biology, Wellesbourne*, v.107, p.17-24, 1985.

LENNÉ, J.M. *Colletotrichum* disease in legumes. In: *Colletotrichum – Biology, Pathology and Control* (eds. J.A. Bailey and M.J. Jeger). CAB International, Wallingford, UK: 237-249, 1992.

LI, W.; YUAN, R.; BURNS, J.K.; TIMMER, L.W.; CHUNG, K. R. Genes for hormone biosynthesis and regulation are highly expressed in citrus flowers infected with the fungus *Colletotrichum acutatum*, causal agent of postbloom fruit drop. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 128:578-583. 2003.

LIMA, W. G.; SPÓSITO, M. B.; AMORIM, L.; GONÇALVES, F.P.; FILHO, P. A. M. *Colletotrichum gloeosporioides*, a new causal agent of citrus post-bloom fruit drop. *European Journal of Plant Pathology*, v. 131, p. 157-165, 2011.

LIU, Y. G.; WHITTIER, R. F. Thermal asymmetric interlaced PCR: Automatable amplification and sequencing of insert end fragments from P1 and YAC clones for chromosome walking. *Genomics*, Orlando, v. 25, p. 674-681. 1995.

LOPEZ, A.M.Q. Taxonomia, patogênese e controle de espécies do gênero *Colletotrichum*. *Revisão Anual de Patologia de Plantas* 291-337. 2001.

LORENZI, H. Plantas daninhas no Brasil. 3º edição. Nova Odessa, SP. Editora Plantarum. 2000.

LUBBE, C.M., DENMAN, S., CANNON, P.F., GROENEWALD, J.Z., LAMPRECHT, S.C., GROUS, P.W. Characterization of *Colletotrichum* species associated with diseases of *Proteaceae*. *The Mycological Society of America*, pp. 1268-1279. 2004.

MACLEAN, D.J., BRAITHWAITE, K.S., MANNERS, J.M.; IRWING, J.A.G. How do we identify and classify fungal pathogens in the era of DNA analysis? *Advances in Plant Pathology* 10: 207-244, 1993

MARINHO, A.M.R.; RODRIGUES-FILHO, E.; MOITINHO, M.L.R.; SANTOS, L.S. Biologically active polyketides produced by *Penicillium janthinellum* isolated as an endophytic fungus from fruits of *Melia azedarach*. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 16(2): 280-283, 2005.

MARTÍNEZ-CULEBRAS, P. V.; QUEROL, A.; SUAREZ- FERNANDEZ, M. B.; GARCLA-LOPEZ, M. D.; BARRIO, E. Phylogenetic relationships among *Colletotrichum* pathogens of strawberry and design of PCR primer for their identification. *Journal of Phytopathology*. 151:135-143. 2003.

MATZ, M. V.; FRADKOV, A. F.; LABAS, Y. A.; SAVITSKY, A. P.; ZARAIKY, A. G.; MARKELOV, M. L.; LUKYANOV, S. A. Fluorescent protein from nonbioluminescent *Anthozoa* species. *National Biotechnology*, 17, 1227. 1999.

MCCUTCHEON TL, CARROLL GC, SCHWAB S. Genotypic diversity in populations of a fungal endophyte from Douglas fir. *Mycologia* 85(2): 180-186. 1993.

MENEZES, J. R. Manejo integrado de doenças e plantas daninhas na cultura de feijão. In: COBUCCI, T.; STEFANO, J.G.di; KLUTHCOUSKI, J. Manejo de plantas daninhas na cultura do feijoeiro em plantio direto. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, Circular Técnica 35, 56p. 1999.

MENEZES, M. Aspectos biológicos e taxonômicos de espécies do gênero *Colletotrichum*. Anais da Academia Pernambucana de Ciências Agrônômica, Recife, v. 3, p. 170-179, 2006.

MENEZES, M. & HANLIN, R.T. Apressoria of Brazilian isolates of *Colletotrichum gloeosporioides*, causal agent of anthracnose diseases. Revista de Microbiologia 27:247–251.1996

MICHIELSE, C.; HOOYKAAS, P.; VAN DEN HONDEL, C.; RAM, A. Agrobacterium-mediated transformation as a tool for functional genomics in fungi. Current Genetics, Berlin, v. 48, p. 1-17. 2005.

MILEO, L.J.; BENTES, J.L.S.; SILVA, J.F.; CHRISTOFFOLETI. Plantas de cobertura de solo como hospedeiras alternativas de *Colletotrichum guaranicola*. Planta Daninha, 24(4): 677-683. 2006

MILEO, L.J.; SILVA, J.F.; BENTES, J.L.S.; CHRISTOFFOLETI. Plantas daninhas hospedeiras alternativas de *Colletotrichum guaranicola* em cultivos de guaraná no Estado do Amazonas. Planta Daninha, 25(4): 771-782. 2007.

MULLINS, E.D.; KANG, S. Transformation: a tool for studying fungal pathogens of plants. Cellular and Life Sciences, Basel, v. 58, p. 2043-2052. 2001.

MILLS, P. R.; SREENIVASAPRASAD, S.; BROEN, A. E. Detection and differentiation of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates using PCR. FEMS Microbiology. Lett, 98: 137 – 144, 1992

MORDUE, J.E.M. *Colletotrichum coccoides*. CMI Description of Pathogenic fungi and Bacteria 131, 1967.

MORIOKA, L.R.I.; FURLANETO, M.C.; BOGAS, A.C.; POMPERMAYER, P.; DUARTE, R.T.D.; VIEIRA, M.L.C.; WATANABE, M.A.E.; FUNGARO, M.H.P. Efficient genetic transformation system for the ochratoxigenic fungus *Aspergillus carbonarius*. Current Microbiology, New York, v. 52, p. 469-472. 2006.

MORIWAKI, J., SATO, T.; TSUKIBOSHI, T. Morphological and molecular characterization of *Colletotrichum boninense* sp. nov. from Japan. Mycoscience 44: 47- 53, 2003.

MULLINS, E.D.; KANG, S. Transformation: a tool for studying fungal pathogens of plants. Cellular and Life Sciences, Basel, v. 58, p. 2043-2052. 2001.

MÜNCH, S.; LUDWIG, N.; FLOß, D. S.; SUGUI, J. A.; KOSZUCKA, A. M.; VOLL, L. M.; SONNEWALD, U.; DEISING, H. B. Identification of virulence genes in the corn pathogen *Colletotrichum graminicola* by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. Molecular Plant Pathology 12, 43–55. 2011.

NEI, M.; KUMAR, S. Molecular Evolution and Phylogenetics. Oxford University Press, New York. 2000.

NEVES, M. F.; TROMBINI, V.G.; MILAN, P.; LOPES, F.F.; CRESSONI, F.; KALAKI, R. L. O retrato da citricultura brasileira. Ribeirão Preto: Markestrat (Centro de Pesquisa e Projetos em Marketing e Estratégia – Faculdade de Economia, Administração e Contabilidade da Universidade de São Paulo), 2010.

NETO, P.A.S.; AZEVEDO, J.L.; ARAÚJO, W.L. Microrganismos Endofíticos: Interação com Plantas e Potencial Biotecnológico. Revista Biotecnologia, 5, 29, 2002

PEIXOTO-NETO, P.A.S.; AZEVEDO, J.L.; ARAÚJO, W.L. Microrganismos endofíticos: interação com plantas e potencial biológico. Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento 29:32-37, 2002.

PERES, N. A. R.; KURAMAE, E. E.; DIAS, M. S. C.; de SOUZA, N. L. Identification of *Colletotrichum* spp. affecting fruit after harvest in Brazil. Journal Phytopathology. 150; 128-134. 2002.

PETRINI, O. Taxonomy of endophytic fungi of aerial plant tissues. In: FOKKEMA, N.J.; HEUVEL, J VAN DEN (Eds), Microbiology of the Phyllosphere. Cambridge, U.K: Cambridge University Press, p.175-187. 1986.

PETRINI, O. Fungal endophytes of tree leaves. In: ANDREWS, J. H.; HIRANO, S. S. (Eds.). Microbial Ecology of Leaves. New York: Springer-Verlag, p. 179-197. 1991.

PHONGPAICHIT, S.; RUNGJINDAMAI, N.; RUKACHAISIRIKUL, V.; SAKAYAROJ, J. Antimicrobial activity in cultures of endophytic fungi isolated from *Garcinia* species. FEMS Immunology Medical Microbiology. United Kingdom, v.48, p.367–372, 2006.

PHOTITA, W., LUMYONG, S., LUMYONG, P.; HYDE, K.D. Fungi on *Musa acuminata* in Hong Kong. Fungal Diversity 6: 99-106. 2001a.

PHOTITA, W., LUMYONG, S., LUMYONG, P.; HYDE, K.D. (Endophytic fungi of wild banana (*Musa acuminata*) at Doi Suthep Pui National Park, in Thailand. Mycological Research 105: 1508-1513. 2001b.

PHOTITA, W.; LUMYONG, S.; LUMYONG, P.; MCKENZIE, E.H.C.; HYDE, K.D. Are some endophytes of *Musa acuminata* latent pathogens? Fungal Diversity 16: 131-140. 2004.

PILEGGI, S.A.V.; OLIVEIRA, S.F.V.; WACULICZ-ANDRADE, C.E.; VICENTE, V.A.; DALZOTO, P.R.; CRUZ, G.K.; GABARDO, J.; MASSOLA, N.Jr.; TORRES, H.J. Jr.; PILEGGI, M.; KAVA-CORDEIRO, V.; GALLI-TERESAWA, L.V.; PIMENTEL, I.C.; GLIENKE, C. Molecular and Morphological Identification of *Colletotrichum gloeosporioides* and *Colletotrichum boninense* isolated from *Maytenus ilicifolia*, Canadian Journal of Microbiology, 55: 1076-1088. 2009.

PORTO, O. M.; ROSSETTI, V.; DORNELLES, C. M. M. 1979. Queda de frutos jovens de citros, causada por *Colletotrichum* sp. no Rio Grande do Sul. In: Congresso Brasileiro de Fruticultura, 5, 1979. Pelotas. Anais. Pelotas: Sociedade Brasileira de Fruticultura, 1979. p. 681-692.

PROMPUTTHA, I., LUMYONG, S., LUMYONG, P., MCKENZIE, E.H.C.; HYDE, K.D. Fungal succession on senescent leaves of *Manglietia garrettii* on Doi Suthep-Pui National Park, northern Thailand. Fungal Diversity 10: 89-100. 2002.

RHO, H.S.; KANG, S.; LEE, Y.H. *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of the plant pathogenic fungus, *Magnaporthe grisea*. Molecular Cell, Cambridge, v. 12, p.407-411.2001.

RODRIGUES, K.F. The foliar fungal endophytes of the Amazonian palm *Euterpe oleracea*. Mycologia 86: 376-385. 1994.

RODRIGUEZ-TOVAR, A.V.; RUIZ-MEDRAN, R.; HERRERA-MARTÍNEZ, A.; BARRERA-FIGUERO, B.E.; HIDALGO-LARA, M.E. REYES-MÁRQUEZ, B.E.;

CABRERA-PONCE, J.L.; VADES, M.; XOCONOSTLE-CÁZARESA, B. Stable genetic transformation of the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius*. Journal of Microbiological Methods, Amsterdam, v. 63, p. 45-54. 2005

ROMÃO, A. S. Análise da comunidade fúngica associada à cana-de-açúcar e estudo da interação *Trichoderma virens*- planta hospedeira. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

SANDERS, G. M.; KORSTEN, L.; WEHNER, F. C. Survey of Fungicide Sensitivity in *Colletotrichum gloeosporioides* from Different Avocado and Mango Production Areas in South Africa. EJPP, Volume 106, P. 745-752, 2000.

SAVKA, M.A.; BLACK, R.C.; BINNS, A.N.; FARRAND, S.K. Translocation and exudation of tumor metabolites in crown plants. Molecular and Plant-Microbe Interactions. Saint Paul, v.9, p. 310-313. 1996.

SCHULZ, B.; BOYLE, C. The endophytic continuum. Mycological Research 109(06): 661-686, 2005.

SHAW, B. D.; KUO, K.; HOCH, H. C. Germination and apressorium development of *Phyllosticta ampellicida* pycnidiospores. Mycologia, Lawrence, v.90, n.2, p.258-268, 1998.

SMITH, B.J.; BLACK, L.L. Morphological, cultural and pathogenic variation among *Colletotrichum* species isolated from strawberry. Plant Disease 74:69-76, 1990.

SONODA, R. M.; HEBB, J. W. Postbloom fruit drop in the Indian River citrus growing area: history and present status. Citrus Industry, Bartow, v. 72, p. 12 – 81, 1991.

SOUZA, G.F.de; Avaliação de nove espécies de leguminosas como hospedeiros alternativos de *Phakopsora pachyrhizi* Syd. & P. Syd. Dourados - MS, Tese de doutorado – Universidade Federal da Grande Dourados, 45p. 2007.

STONE, J.K. Fine structure of latent infections by *Rhabdocline parkeri* on Douglas-fir, with observations on uninfected epidermal cells. Canadian Journal of Botany 66, p.45-54, 1988.

STROBEL, A. G. Rainforest Endophytes and Bioactive Products. Critical Reviews in Biotechnology. Boca Raton, v.22, n.4, p.315-333, 2002.

STROBEL, A. G. Endophytes as sources of bioactive products. Microbes and Infection, Paris, v.5. p.535-544, 2003.

STROBEL, G.; DAISY, B. Bioprospecting for Microbial Endophytes and Their Natural Products. Microbiol. Mol. Biol. Rev., 67, 491–502. 2003.

STROBEL, G.; DAISY, B.; CASTILLO, U.; HARPER, J. Natural products from endophytic microorganisms. J. Nat. Prod., 67: 257-268. 2004.

STAFFORD, H.A. Crown gall disease na *Agrobacterium tumefaciens*: a study of the history, present knowledge, missing information, and impact on molecular genetics. Botanical Review, New York, v. 66, p. 101-118. 2000.

STINSON, M.; ERZA, D.; HESS, W. M.; SEARS, J.; STROBEL, G. An endophytic *Gliocladium* sp. Of *Eucryphia cordifolia* producing selective volatile antimicrobial compounds. Plant Science, St. Paul, v165, p.913-922, 2003.

SUGUI, J.A.; CHANG, Y.C.; KWON-CHUNG, K.J. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Apergillus fumigates*: an efficient tool for the insertional mutagenesis and targeted gene disruption. Applied and Environmental Microbiology, Washington, v. 71, p. 1798-1802. 2005.

SUTTON, B.C. The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. In: *Colletotrichum* Biology, Pathology and Control (eds. J.A. Bailey and M.J. Jeger). CAB International, 1-26. 1992.

TAESHOWISAN, T.; PEBERDY, J.F.; LUMYONG, S. Isolation of endophytic actinomycetes from selected plants and their antifungal. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 19: 381-385, 2003.

TALHINHAS, P.; SREENIVASAPRASAD, S.; NEVES-MARTINS, J.; OLIVEIRA, H. Genetic and Morphological Characterization of *Colletotrichum acutatum* causin anthracnose of luppins . Phytopathology 92: 986-996, 2002

TALHINHAS, P.; MUTHUMEENAKSHI, S.; NEVES-MARTINS, J.; OLIVEIRA, H.; SREENIVASAPRASAD, S. *Agrobacterium*-mediated transformation and insertional

mutagenesis in *Colletotrichum acutatum* investigating varied pathogenicity lifestyles. Molecular Biotechnology, Totowa, v. 39, p. 57-67.2008.

TAN, R.X.; ZOU, W.X. Endophytes: a rich source of functional metabolites. Natural Product Reports.18, 4: 448-459, 2001.

TANG, A.M.C., HYDE, K.D.; CORLETT, R.T. Diversity of fungi on wild fruits in Hong Kong. Fungal Diversity 14: 165-185, 2003.

TAYLOR, J. W.; JACOBSON, D. J.; KROKEN. Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. Fungal Genetics and Biology, 31, 21–32.2000.

TIMMER, L.W., AGOSTINI, J.P., ZITKO, S.E., ZULFIQAR, M. Postbloom fruit drop, a increasingly prevalent disease of citrus in the Americas. Plant Disease,78, n.4, p.329- 334, 1994.

TIMMER, L. W., & BROWN, G. E. Biology and control of anthracnose diseases of citrus. In D. Prusky, S. Freeman, & M. B. Dickman (Eds.), *Colletotrichum*. Host Specificity, Pathology, and Host-Pathogen Interaction (pp. 300–316). Saint Paul: APS. 2000

TOOFANEE, S.B.; DULYMAMODE, R. Fungal endophytes associated with *Cordemoya integrifolia*. Fungal Diversity 11: 169-175, 2002.

TOZZE JUNIOR, H.J.; MELLO, M.B.A.; MASSOLA JUNIOR, N.S. Caracterização morfológica e fisiológica de *Colletotrichum* SP de hortaliças Solanaceas. Summa Phytopathologica. Botucatu vol.32 (1) 71-79, 2006.

TOZZE JUNIOR, H. J. Caracterização e identificação de espécies *Colletotrichum* associadas à antracnose do pimentão (*Capsicum annum*) no Brasil. Dissertação de Mestrado . Piracicaba. SP, 2007.

TZFIRA, T.; CITOVSKEY, V. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of plants: biology and biotechnology. Current Opinion in Biotechnology. Philadelphia, v. 17, p. 6550-6558. 2006.

VAN ATTIKUM, H.; BUNDOK, P.; HOOYKAAS, P.J.J.; Non-homologous end-joining proteins are required for *Agrobacterium* T-DNA integration. EMBO Journal, London, v. 20, p. 6550-6558. 2001.

VINNERE, O. Approaches to species delineation in anamorphic (mitosporic) fungi: a study of two extreme cases. Uppsala: Faculty of Science and a Tecnology, p72, 2004.

WATSON, J. D.; GILMAN, M.; WITKOSWSKI, J.; ZOLLER, M. Recombinant DNA. 2nd ed. New York: Freeman and Company. 1992.

WEI, X.; ZHU, B. An efficient and stable method for the transformation of heterogeneous genes into *Cephalosporium acremonium* mediated by *Agrobacterium tumefaciens* Journal of Microbiology and Biotechnology, Seoul, v. 15, p. 683-688. 2005.

WEIR, B. S.; JOHNSTON, P. R.; DAMM, U. The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. – Stud Mycol. 73: 115–180. 2012.

WHITE, D.; CHEN, W. Towards identifying pathogenic determinants of the chickpea pathogen *Ascochyta rabiei*. European Journal of Plant Pathology, Dordrecht, v. 119, p. 3-12. 2007.

WHITE, J. F., JR.; COLE, G. T. Endophyte-host association in forage grasses III. In vitro inhibition of fungi by *Acremonium coenophialum*. Mycologia 77, 487- 489. 1985.

WHITE, J. F., JR.; COLE, G. T. Endophyte-host associations in forage grasses. IV. The endophyte of *Festuca versuta*. Mycologia 78:102-107. 1986.

WHITE, J. F., JR.; MORROW, A. C. Endophyte-host associations in forage grasses. XII. A fungal endophyte of *Trichachne insularis* belonging to *Pseudocercospora*. Mycologia, 82, p.218-226, 1990.

WILSON, A. D.; CLEMENTE, S. L.; KAISER, W. J. Survey and detection of endophytic fungi in *Lolium* germ plasma by direct staining and aphid assays. Plant Disease, St. Paul, v.75, p.169-173, 1991.

WOLOSHUK, C.P.; SISLER, H.D. Tricyclazole, pyroquilon, tetrachlorophthalide, PCBA, coumarine and related compounds inhibit melanization and epidermal penetration by *Pyricularia oryzae*. Journal of Pesticide Science, Tokyo, v. 7, p. 161-166, 1982.

WONG, F.P.; MIDLAND, S.L. Sensitivity distributions of California populations of *Colletotrichum cereale* to the DMI fungicides propiconazole, myclobutanil, tebuconazole, and triadimefon. *Plant Disease*, Saint Paul, v. 91, p. 1547-1555, 2007.

ZEILINGER, S. Gene disruption in *Trichoderma atroviride* via *Agrobacterium*-mediated transformation. *Current Genetics*, Berlin, v. 45, p. 54-60. 2004.

ZHANG, A.; LU, P.; DAHL-ROSHAK, A.M.; PARESS, P.S.; KENNEDY, S.; TKACZ, J.S.; AN, Z. Efficient disruption of a polyketide synthase gene(pks 1) required for melanin synthesis through *Agrobacterium*-mediated transformation of *Glaea lozoyensis*. *Molecular Genetics and Genomics*, Berlin, v. 268, p. 645-655. 2003.

ZHANG, Y.; LIU, S. CHE, Y. LIU, X. Epicoccins A-D, epipolythiodioxopiperazines from a *Cordyceps* colonizing isolates of *Epicoccum nigrum*. *Journal of Natural Product*, Pittsburgh, v. 70, p. 1522-1525. 2007.

ZULFIQAR, M.; BRLANSKY, R.H.; TIMMER, L.W. Infection of flower and vegetative tissues of citrus by *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides*. *Mycologia* 88(1): 121-128. 1996

ZWIERS, L.H.; DE WAARD, M.A.; Efficient *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gene disruption in the phytopathogen *Mycosphaerella graminicola*. *Current Genetics*, Berlin, v.39, p.. 388-393. 2001.